



T.C.  
NECMETTİN ERBAKANÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



PERİFERİK SİNİR HASARI  
TEDAVİLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE  
POLİMER BAZLI DOKU İSKELESİ  
GELİŞTİRME VE İN-VİTRO PERFORMANS  
ÇALIŞMALARI

Saandia BACAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Şubat-2020  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Saandia BACAR tarafından hazırlanan “PERİFERİK SİNİR HASARI TEDAVİLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE POLİMER BAZLI DOKU İSKELESİ GELİŞTİRME VE İN-VİTRO PERFORMANS ÇALIŞMALARI” adlı tez çalışması 17/02/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği /oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

#### Başkan

Doç. Dr. Nadir KOÇAK

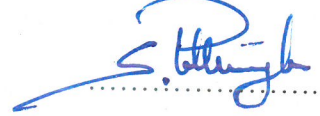
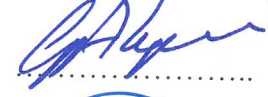
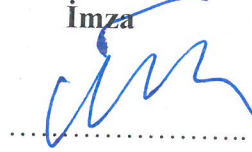
#### Danışman

Prof. Dr. Emine Güler AKGEMCI

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU

İmza



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ..../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 181715001 nolu proje ile desteklenmiştir.

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza



Saandia BACAR

Tarih: 06.03.2020

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANSTEZİ

# PERİFERİK SİNİR HASARI TEDAVİLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE POLİMER BAZLI DOKU İSKELESİ GELİŞTİRME VE İN-VİTRO PERFORMANS ÇALIŞMALARI

**Saandia BACAR**

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Emine Güler AKGEMCİ**

**2020, 62 Sayfa**

**Jüri**

**Prof. Dr. Emine Güler AKGEMCİ**

**Doç. Dr. Nadir KOÇAK**

**Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU**

Doku mühendisliği çalışmaları, son yıllarda doku nakli problemlerine alternatif oluşturmak için, vücut hasarını yenileyebilen yapay dokular oluşturma çalışmalarına odaklanmıştır. Doğal ve sentetik nanofiberler, periferik nöral lezyonlar dâhil olmak üzere birçok lezyon tipinin onarımında başarıyla kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasının temel amacı, elektroğirme yöntemiyle biyoaktif nanofiberler geliştirmek ve nöral doku mühendisliğinde potansiyel kullanımları açısından sıçan feokromositoma hücreleri (PC12) üzerindeki performanslarını in vitro olarak incelemektir. Bu çalışmada, nanofiber materyalleri sentezlendikten sonra, belirlenen optimum şartlarda, elektroğirme yöntemiyle üç farklı nanofiber elde edilmiştir: biyobozunur poli-ε-kaprolakton (PCL) nanofiberler, hibrit PCL (%70) ve biyoaktif cam (%30) (PCL/BC) nanofiberler ve hibrit nanofiberlere B12 vitamini ilavesiyle elde edilen (PCL/BC) -B12 nanofiberler. Hibrit biyomateryallerin sentezinde sol-jel yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi (EDX) ve Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) ile yapıldı. Bu fiberlerin, biyoyumluluklarını test etmek için L929 fibroblastik hücreler ve PC12 hücreleri ile hücre canlılık testleri yapıldı. Sinir büyüme faktörü (NGF) tarafından indüklenen PC12 hücrelerinin hücresel farklılaşması, bu hücrelerin morfolojik modifikasyonu ile belirlendi. PC12 hücre farklılaşması için hücre başına nörit ve nörit uzunluğu NGF konsantrasyonuna göre değerlendirildi. NGF-Elisa testi sonuçları, PC12 hücrelerinin farklılaşmasının NGF konsantrasyonuna bağlı olduğunu gösterdi. En uzun nöritlerin, yüksek NGF konsantrasyonunda (100 ng/mL) elde edildiği gözlemlendi. Son olarak, üretilen üç nanofiber için NGF'nin kontrollü salım testi yapıldı ve her üç fiberde de, NGF enjeksiyonundan sonraki ilk on dakika içerisinde sinir büyüme faktörü salınımı yeteneği gözlemlendi. B12 vitamini içeren hibrit nanofiberlerin, 16 saatlik inkübasyondan sonra en iyi sinir büyüme faktörü salınımına sahip olduğu belirlendi.

Çalışılan nanofiberlerin toksik olmamaları, hücre proliferasyonunu desteklemeleri ve sinir büyüme faktörü salınımı yetenekleri, bu nanofiberlerin periferik sinir lezyonlarının rejenerasyonunda doku iskelesi olarak önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoaktif cam, B12 vitamini, elektroğirme yöntemi, PC12 hücre hattı, periferik sinir hasarı, poli-ε-kaprolakton, sinir büyüme faktörü.

## **ABSTRACT**

### **MS THESIS**

# **DEVELOPMENT OF POLIMER-BASED TISSUE SCAFFOLDS FOR PERIFERIC NERVE INJURIES AND THEIR IN-VITRO PERFORMANCE STUDIES**

**Saandia BACAR**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**Advisor: Prof. Dr. Emine Güler AKGEMCİ**

**2020, 62 Pages**

**Jury**

**Prof. Dr. Emine Güler AKGEMCİ**

**Assoc.Prof.Dr. Nadir KOÇAK**

**Asst.Prof.Dr Suray PEHLİVANOĞLU**

Tissue engineering studies have focused on creating artificial tissues that can renew body damage in order to create an alternative to tissue transplant problems in recent years. Natural and synthetic nanofibers are successfully used in the repair of many types of damage, including peripheral neural damage.

The main objective of this thesis study is to develop bioactive nanofibers by electrospinning method and to examine their performances on rat pheochromocytoma cells (PC12) for their potential use in the engineering of neuronal tissues. In this study, after the biomaterials were synthesized, three different nanofibers were obtained by the electrospinning method under determined optimal conditions: biodegradable poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibers, PCL hybrids (70%) and glass bioactive (30%) (PCL/BC) and (PCL/BC) -B12 nanofibers obtained by adding vitamin B12 to hybrid nanofibers. The sol-gel method has been used in synthesized of hydrid biomaterials. The nanofibers obtained were characterized by scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). To test the biocompatibility of these nanofibers, cell viability tests were carried out with fibroblastic cells L929 and PC12 cells. The cellular differentiation of PC12 cells induced by nerve growth factor (NGF) was determined by the morphological modification of these cells. For the differentiation of PC12 cells, the neurite per cell and the length of the neurites were evaluated as a function of the concentration of NGF. The results of the NGF-Elisa tests have shown that the differentiation of PC12 cells depends on the concentration of NGF. It was observed that the longest neurites were obtained at a high concentration of NGF (100 ng / ml). Finally, a controlled release test for NGF was performed with these three types of fabricated nanofibers, and the ability to release nerve growth factors in these three fabricated fibers was observed in the first ten minutes after the injection of NGF. The bioactive hybrid nanofibers containing vitamin B12 were determined to have the best release of nerve growth factor after 16 hours of incubation.

The nanofibers studied are non-toxic, promote cell proliferation and their capacities for releasing nerve growth factors show that these nanofibers can play an important role in the regeneration of tissues after peripheral nerve damage.

**Keywords:** Bioactive glass, electrospinning method, nerve growth factor, PC12 cell line, peripheric nerve injuries, poly- $\epsilon$ -caprolactone, vitamin B12.

## ÖNSÖZ

"Seni bütün eksikliklerden uzak tutarız. Senin bize öğrettiklerinden başka bizim hiçbir bilgimiz yoktur. Şüphesiz her şeyi hakkıyla bilen, her şeyi hikmetle yapan sensin" dediler

KUR'AN-I KERİM [Sure 2 –Ayet 32]

Tez çalışmamın başarısı , büyük ölçüde aşağıda belirtilen kişilerin teşvik ve direktiflerine ve BAP tarafından sağlanan 181715001 nolu projenin büyük desteğine bağlıdır. Öncelikle BAP'a bu projenin gerçekleştirilmesi için gerekli tüm materyalleri finanse ettiği için teşekkür ediyorum.

Yaptığım çabaların yanı sıra projemin başarısı, büyük ölçüde aşağıda adı geçen kişilerin teşvik, direktiflerine ve BAP tarafından sağlanan büyük desteğe bağlıdır. Öncelikle BAP'a bu projenin (181715001 nolu) gerçekleştirilmesi için gerekli tüm materyalleri finanse ettiği için sönsüz teşekkürlerimi sunuyorum. Bu projenin başarısına katılan tüm insanlara teşekkürlerimi sunuyorum:

İlk olarak, danışman hocam, Prof. Emine Güler AKGEMCİ'ye, projem boyunca muazzam desteği ve sürekli tavsiyesi nedeniyle derin minnettarlığımı ve saygı duyduğumu ifade etmek istiyorum. İlk danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gürbüz ÇOMAK'a yüksek lisansımın ilk yılında beni sabırla desteklediği ve beni araştırmaya başlattığı ve özellikle bu tez konusunu önerdiği için, Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU hocama, benimle çalışmayı kabul ettiği için ve bu projeyi gerçekleştirmeme yardımcı olmak için gösterdiği tüm çabalardan dolayı ve Prof.Dr. Esra MARTİN Hocama, laboratuvarında çalışmama izin verdiğinden dolayı içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, Laboratuvar arkadaşım Gizem YILMAZ'a, büyük desteğinden dolayı, oda arkadaşım Fatmanur AKGÜN'ün teşviki ve yazım hatalarımı sürekli düzelttiği için ve tezin gerçekleştirilmesine uzaktan veya yakından katılan herkese teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, bütün aileme, her zaman yanımda oldukları için ve büyük sevgi ve desteklerinden dolayı özellikle hayatımın iki kahramanına, Babama ve Anneme, okul kariyerim boyunca başarılı olmamdaki yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi ifade etmek istiyorum.

Saandia BACAR  
KONYA-2020

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1.DOKUMÜHENDİSLİĞİ.....	3
1.1.1. Doku Mühendisliğinin Önemi.....	3
1.1.2. Sinir Dokusu Mühendisliği.....	4
1.1.2.1. Sinir sistemi fizyolojisi.....	4
1.1.2.2. Periferik sinir.....	5
1.1.2.3. Sinir Yaralanması.....	6
1.1.2.4. Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması.....	6
1.1.2.5. Sinir büyüme faktörü (NGF) ve sinir onarımı.....	7
1.1.2.6. B12 Vitamininin (Siyanokobalamin) sinir hasarına etkisi.....	8
1.2. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOMATERYALLER.....	9
1.2.1. Doğal Polimerler.....	9
1.2.2. Sentetik Polimerler.....	11
1.2.3. Biyoaktif Cam.....	12
1.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE İSKELE.....	15
1.3.1. İskele mimarisi.....	15
1.3.2. İskele imalat teknikleri.....	16
1.3.2.1. Kendiliğinden montaj tekniği.....	16
1.3.2.2. Faz ayırma.....	16
1.3.2.3. Elektroğirme.....	16
1.3.2.3.1. Sol-jel yöntemi.....	17
1.3.2.3.2. Elektroğirme Aparatı.....	19
1.3.2.3.3. Elektroğirme parametreleri.....	20
1.3.2.3.3.1. Uygulanan voltajın etkisi.....	20
1.3.2.3.3.2. Çözelti akışının etkisi.....	20
1.3.2.3.3.3. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin etkisi.....	21
1.3.2.3.3.4. Polimer konsantrasyonunun ve çözeltinin viskozitesinin etkileri.....	21
1.3.2.3.3.5. Nem ve sıcaklığın etkisi.....	22
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	23

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan kimyasalmaddeler.....	27
3.2. Polimer çözeltilerin hazırlanması.....	27
3.3. Elektroğirme işlemi.....	27
3.4. Polikaprolakton nanofiberlerin elektroğirme parametresinin optimizasyonu...28	
3.5. Hibrit biyoaktif camların sentezi (PCL/BC).....	29
3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Nanofiber Analizi .....	30
3.7. EDX spektroskopisi ile (Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) fiber analizi...31	
3.8. Sentezlenmiş biyomalzemelerin FT-IR analizi .....	31
3.9. İn vitro çalışmalar.....	31
3.9.1. PC12 hücre kültürü.....	31
3.9.2. Kültür kabı yüzeyinin Matrijel ile kaplanması.....	31
3.9.3. Nanofiberlerin L929 hücreler üzerindeki hücre canlılığı testi.....	32
3.9.4. Nanofiberlerin PC12 hücreler üzerindeki hücre canlılığı testi.....	32
3.9.5. PC12 hücre farklılaşması çalışması.....	32
3.9.6. Sinir büyüme faktörünün biyoaktivitesinin in vitro değerlendirilmesi.....	33
3.9.7. NGF'nin in vitro salınımı çalışması.....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Fiber morfolojisinin optimizasyon parametreleri üzerine etkisi.....	35
4.2. Nanofiberlerin SEM ve EDX ile karakterizasyonu.....	37
4.2.1. Nanofiberlerin SEM ile karakterizasyonu.....	37
4.2.2. Sentezlenen nanofiberlerin EDX ile karakterizasyonu.....	38
4.3. FITR analizi ile biyomalzemelerin karakterizasyonu sonucu .....	41
4.4. Sentezlenmiş nanofiberlerde L929 hücrelerinin hücre canlılığı testinin sonucu...42	
4.5. Sentezlenmiş nanofiberlerde PC12 hücrelerinin hücre canlılığı testinin sonucu..43	
4.6. Hücre farklılaşması sonucu.....	45
4.7. PC12 hücrelerinin NGF üretim seviyeleri.....	47
4.8. Elektroğirilmiş fiberlerden NGF salınımı.....	48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
5.1 Sonuçlar.....	49
5.2 Öneriler.....	50
KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	62

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Biyopsi ile başlayan ve doku implantasyonu ile sonuçlanan bir doku mühendisliği Yaklaşımının şeması.....	4
1.2 Periferik sinirin şematik yapısı.....	5
1.3 NGF reseptörlerinin sinyalizasyonu.....	8
1.4 B12 vitamini yapısal şeması.....	8
1.5 Biyoaktif camların iskelet sistemi dışındaki uygulamalarının kronolojisi.....	13
1.6 Biyoaktif camların yumuşak dokuya ve kemiğe bağlamasını bileşime bağlılığı (%kütlece).....	14
1.7 Sol-jel işleminin şeması.....	19
1.8 Elektroçirme cihazının şeması.....	19
2.1 Yu.W ve ark. nın kullandığı deneysel model.....	23
2.2 Marquardt ve Fiyatı'nın geliştirdikleri 13-93 B3 borat biyoaktif camın SEM Görüntüleri.....	24
2.3 Koudehi ve ark'ın elde ettikleri nanokompozit kanalların SEM görüntüleri.....	25
2.4 (PCL/BC)H5050 hibrid için elektro-eğirilmiş fiber çapının dağılımının SEM görüntüsü ve grafiği.....	25
2.5 PC12 hücreleri üzerindeki PCL nanofiberlerinin hücre canlılığı testi.....	26
3.1 Elektroçirme cihazı (Ne 100 Electrospinning Devices NanoSpinner).....	28
3.2 Plaka kollektörünü kaplayan alüminyum folyo üzerine fiber toplama.....	28
3.3 Elektroçirme ve nanofiberlerin karakterizasyon şeması.....	29
3.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	30
4.1 Polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine mesafenin etkisi.....	36
4.2 Uygulanan voltajın polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine etkisi.....	36
4.3 Konsantrasyonun polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine etkisi.....	36
4.4 Çözeltilerin akışının polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine etkisi.....	37
4.5 PCL nanofiberlerin SEM görüntüsü ve nanofiberlerin çap dağılım diyagramı.....	37
4.6 (PCL/BC) nanofiberlerin SEM görüntüsü ve fiber çap dağılım diyagramı.....	38
4.7 (PCL/BC)-B12 nanofiberlerin SEM görüntüsü ve fiber çap dağılım diyagramı.....	38
4.8 (PCL/BC) nanofiberlerin EDX spektrumu, atomları için elementel haritalanması.....	39
4.9 (PCL/BC)-B12 nanofiberlerin EDX spektrumu, atomları için elementel haritalanması.....	40
4.10 Sentezlenen nanofiberlerin FT-IR spektrumları.....	41
4.11 Nanofiberlerde L929 hücre ekiminden sonra MTT testi.....	42
4.12 Nanofiberlerde kültüre edilen L929 hücrelerinin metilen mavisi ile boyandıktan sonra inverted mikroskoptaki görüntüleri.....	43
4.13 Nanofiberlerde PC12 hücre ekiminden sonra MTT testi.....	43
4.14 Nanofiberlerde kültüre edilen PC12 hücrelerinin kital viyole ile boyandıktan sonra inverted mikroskopta görüntüleri.....	44
4.15 Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ng /mL) NGF, 5 günde ilave edikten	

sonra PC12 hücrelerinin morfolojisinin etkisi.....	45
4.16 Hücreler tarafından geliştirilen nöritlerin uzunluğunu gösteren diyagram.....	46
4.17 PC12 hücrelerinin, hücre başına nörit sayısını gösteren nöral hücrelere farklılaşması.....	46
4.18 Hücre başına geliştirilen nörit sayısını gösteren diyagram.....	47
4.19 NGF'nin ELISA testi ile teyit edilen PC12 hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisi.....	47
4.20 NGF'nin üç tip fiberden (PCL fiber; (PCL/BC) fiber ve (PCL/BC) -B12 fiber) salınması.....	48



## TABLULAR LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. Optimizasyon testleri sırasında çeşitli nanofiberler üretmek için elektroğirme parametreleri.....	28
Tablo 4.1 Fiber morfolojisinin farklı parametrelere bağlılığı.....	35



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$B_2O_3$	: Borik oksit
$CaO$	: Kalsiyum oksit
$CO_2$	: Karbondioksit
$CuO$	: Bakır oksit
$HCl$	: Hidroklorik asit
$KH_2PO_4$	: Potasyum dihidrojen fosfat
$K_2O$	: Potasyum oksit
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	: Magnezyum klorid heksahidrat
$MgO$	: Magnezyum oksit
$NaCl$	: Sodyum klorür
$NaH_2PO_4$	: Sodyum dihidrojen fosfat
$Na_2O$	: Sodyum oksit
$P_2O_5$	: Fosfor pentoksit
$SiO_2$	: Silisyum dioksit
$ZnO$	: Çinko oksit

### Kısaltmalar

AP	: Aksiyon potansiyeli
BC	: Biyoaktif camlar
DM	: Doku mühendisliği
HRP	: Yaban turpu peroksidaz
SF	: İpek fibroin
SK	: Sinir kanalları
MSS	: Merkezi sinir sistemi
PCL	: Poli $\epsilon$ -kaprolakton
PCL/BC	: Poli $\epsilon$ -kaprolakton/Biyoaktif cam
(PCL/BC)-B12	: (Poli $\epsilon$ -kaprolakton/Biyoaktif cam) – B12 vitamini
PSS	: Periferik sinir sistemi
TMB	: 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidin
Akt	: Protein kinaz B
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle's ortamı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DO	: Optik yoğunluk
EDX	: Enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi
ELİSA	: Enzim bağlantılı immünosorbent deneyi
ERK	: Hücre dışı sinyal regülasyonlu kinazlar
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	: Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
HA	: Hyaluronik asit
MEK	: Mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz
MTT	: Tiazolil mavi tetrazolium bromür deneyi

NF-B	: Bir transkripsiyon faktörü
NGF	: Sinir büyüme faktörü
PBS	: Fetal sığır serumu
PCL	: Polikaprolakton
PEO	: Polietilen oksit
PGA	: Poli (glikolik asit)
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PLA	: Poli (laktik asit)
PLC	: Fosfolipaz C
p <sup>75(NTR)</sup>	: Nörotrofin reseptörü
PS	: Penisilin-streptomisin
RH	: Bağıl nem
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
SF	: İpek fibroin
PLGA	: Poli D, L-laktik-ko-glikolik asit
TCAC	: Trikarboksilik asit döngüsü
TEOS	: Tetraetil ortosilikat
TEP	: Trietil fosfat
THF	: Tetrahidrofuran
TrkA	: Nörotrofik tirozin kinaz reseptörü

# 1. GİRİŞ

Doku mühendisliği, biyomalzemeler, hücreler ve/veya faktörlerin kullanımıyla canlı dokuların restorasyonu (onarım) ya da rejenerasyonu (yenilenme) için özel biyoyumlu kompleksin yapımına ve işletmeye alınmasına yol açan, tasarımla ilgili ekipman, üretim prensipleri, araştırma ve kontrolünü takip eden biyolojik, kimyasal ve fiziksel tekniklerin uygulaması olarak tanımlanabilir (Luc ve ark., 2014).

Aslında, doku mühendisliği kavramıyla, dokuların restorasyonu, çok uzun süredir standart bir onarım yöntemi olarak bilinen aşılama tekniğinin yerini almaktadır. Şimdiye kadar, farklı organlar (kalp, böbrekler, karaciğer, akciğer, pankreas, bağırsak ve timus) ve dokular (kemik, tendon, kornea, cilt, kalp kapakçıkları, sinirler ve damarlar) hastalara, temel fizyolojik fonksiyonlarını onarmak hatta hayatlarını kurtarmak için nakledilmiştir. Transplantasyon yöntemi, ototransplantasyon (vücudun bir kısmının aynı bireyde başka bir kısma nakli), allotransplantasyon ya da allogreft (genetik olarak aynı olmayan türün bireyleri arasında transplantasyon) ve ksenotransplantasyon (iki farklı tür arasında nakil) olmak üzere üçe ayrılır (Yi, 2017).

Günümüzde organ nakli dezavantajlı hale gelmektedir. Çünkü hastalar için başka sorunlara (özellikle donör bölgesinin greft reddi gibi) neden olmaktadır (Chimutengwende-Gordon ve Khan, 2012). Allogreft yöntemleri, organ donörlerini gerektirdiğinden ve mevcut donörlerin yetersizliği yüzünden giderek zorlaşmaktadır. Organ bağışçısı yetersizliği her yıl arttığı için, nakil yöntemi sınırlı hale gelmektedir. (Badylak, 2011). Bu, araştırmacıların, periferik sinir lezyonları dâhil olmak üzere çeşitli lezyonların tedavisi için greft zorluğunun üstesinden gelebilecek başka alternatifler geliştirilmesine neden olmuştur.

Periferik sinir yaralanmaları, hastalara çok fazla hasar verir ve tedavisi zordur. Çeşitli sentetik ve doğal polimerler kullanılarak merkezi ve periferik sinir sistemlerinde nöronal rejenerasyon, bu alandaki birçok çalışma tarafından kanıtlanarak deneysel bir başarı olmuştur (Snigdha, Sabu ve Radhakrishnan, 2017). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, bir polimer ve biyoaktif cam karışımı kullanılarak, nöronal onarımın etkinliğini de göstermiştir (Mohammadkhah ve ark., 2015).

Bu tez çalışması, nöronal onarım için kullanılan poli-ε-kaprolakton nanofiber ve biyoaktif cam nanofiberlerin geliştirilmesine dayanmaktadır. Nanofiber çözeltileri hazırlandıktan sonra, nanofiberlerin elektroçirme işleminde kullanılacak parametrelerinin

optimizasyonu yapılmıştır. Elektroğirme işlemi için optimum parametreler; çözücüye göre kütlece % 10 polimer konsantrasyonu, 15 kV voltaj, 20 cm plaka mesafesi ve 2 mL/saat çözelti akış hızı olarak belirlenmiştir. Bu parametreler kullanılarak önce saf poli-ε-kaprolakton (PCL) fiberler üretilmiştir. Daha sonra, hibrit nanofiber için en iyi bileşimin, % 70 polikaprolakton ve % 30 biyoaktif cam olduğu belirlenerek, polikaprolakton/biyoaktif cam (PCL/BG) nanofiberler üretildi. Son olarak aynı hibrit çözeltiye B12 vitamini (Siyanokobalamin) eklenerek de (PCL/BC)-B12 nanofiberler elde edilmiştir. Elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonu SEM, EDX ve FTIR analizleri ile yapıldı. Biyocanlılık testleri yapılan fiberlere, sinir büyüme faktörü (NGF) emdirildi ve periferik sinir hasarının tedavisinde greft olarak kullanılabilirlikleri araştırıldı. Sıçan feokromasitoma hücre hattı, PC-12 hücreleri sinir büyüme faktörünün (NGF) uygulanmasına tepki verebildikleri ve nöronal fenotipi ifade edebildiklerinden dolayı nöronal farklılaşma için in-vitro model olarak kullanılmıştır.

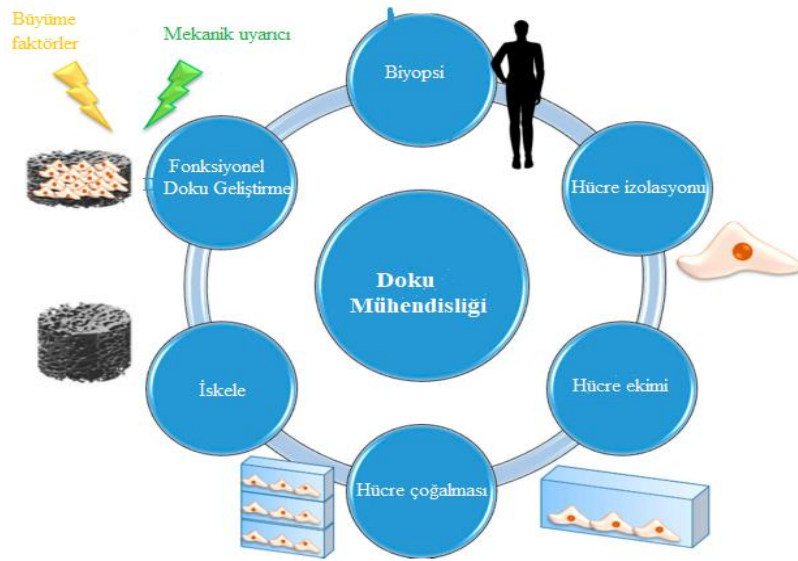
## 1.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

### 1.1.1. Doku Mühendisliğinin Önemi

Organ nakli ihtiyacı her yıl artmaktadır ve milyarlarca hasta organ veya doku kaybından muzdariptir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013'te, 54.000'den fazla hasta böbrek, 12.000 hasta karaciğer, 1.200 hasta kalp ve 1.300 hasta akciğer nakli için beklemekteydi (OPTN ve SRTR, 2011). Fransa'da, 1 Ocak 2015 itibariyle, bu rakamın 13.750 hastada gerçekleştiği ve nakil almadıkları için zamanla 550'den fazla hastanın öleceği tahmin edilmektedir. Yaklaşık olarak, bir nakilden faydalanmak için ortalama bekleme süresi 3 yıldan fazladır (Deneufchâtel, 2016). İnsanların yaşam beklentisi, travma, hastalık veya doğumsal anomalilerden zarar gören dokuların yenilenmesini teşvik edebilecek yeni terapötik stratejilerin sürekli geliştirilmesini gerektirir (Sivolella ve ark., 2014). Sonuç olarak, araştırmacılar sürekli olarak nakil performansını aşabilecek biyo-mühendislik çözümleri geliştirmektedirler.

Doku mühendisliği, hasar görmüş dokunun onarımı ve yenilenmesine umut verici yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır (Wang, 2013). Doku Mühendisliği terimi (DM), ilk olarak 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından bilimsel bir toplantıda tanıtılan ve hücre biyolojisi, malzeme bilimi, kimya, moleküler biyoloji, mühendislik ve tıpalanlarını kapsayan daha geniş bir bilimsel alandır (Langer ve Vacanti, 1993). Nispeten yeni olan bu alanda, dokuları oluşturmak için canlı hücreler, biyoyumlu malzemeler ve uygun biyokimyasal faktörler (örneğin büyüme faktörleri) ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır (Berthiaume ve ark., 2011). Şekil 1.1 de, biyopsiden biyokimyasal faktörleri içeren ve hasarlı dokular için implant görevi gören iskele oluşumuna kadar doku mühendisliğinin aşamaları görülmektedir.

Doku mühendisliği, organ yetmezliği olan veya ağır hasar görmüş organları iyileştirebilecek veya değiştirebilecek yeni sentetik doku ve / veya organ greft yapıları oluşturmayı amaçlamaktadır. Bu rejenerasyon yönteminde, doku oluşumu için bir matris ile birleştirilmiş hücreler kullanılır (Vacan ve Langer, 1999). Doku mühendisliğinde, çoğalmasını ve yeni doku oluşumuna farklılaşmasını teşvik ederek hücreleri destekleyebilen çok gözenekli yapay hücre dışı matrisler veya biyomimetik iskeleler geliştirilerek, dokuların yenilenmesi kolaylaştırılır (Mano ve ark. 2007).



Şekil 1.1. Biyopsi ile başlayan ve doku implantasyonu ile sonuçlanan bir doku mühendisliği yaklaşımının şeması (Fiume, Elisa, 2018).

## 1.1.2. Sinir Dokusu Mühendisliği

### 1.1.2.1. Sinir sistemi fizyolojisi

Sinir sistemi, tüm vücut düzeyinde yer alan tüm bilgilerin iletişim ve kontrolü için merkezi bir ağıdır (Bugnicourt 2011). Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS) ve periferik sinir sistemi (PSS) olmak üzere iki ayrı ve birbirine bağlı bölümden oluşur:

- 1) Ensefalon ve omuriliği içeren merkezi sinir sistemi, duyuşal bilgi alır, bu bilgileri sinir sistemine entegre eder ve sonra motor tepkileri geliştirir.
- 2) Merkezi sinir sisteminin dışında bulunan PSS, ganglionları ve periferik sinirleri içerir. Bu sinirler, merkezi sinir sistemi ile vücudun çeşitli organları arasındaki bağlantı alanlarını sunar.

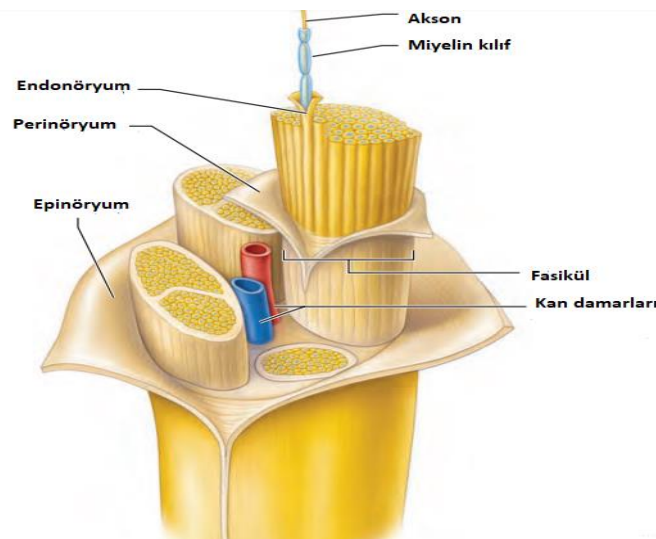
Sinir sistemi, türlere bağılı olarak farklı oranlarda nöronlar ve gliyal hücreler olmak üzere iki tür nöral hücreden oluşur. İnsanlarda, nöronların % 10'u ve gliyal hücrelerin % 90'ı bulunur (Allen ve Barres, 2009).

Sinir, nöronlardan ve gliyal hücrelerden (schwann hücreleri) oluşur. Nöronlar, elektrik sinyallerinin yayıldığı aksonlar (aksiyon potansiyeli) tarafından uzatılır. Bu aksonlar, miyelin tabakasını oluşturan schwann hücreleriyle çevrilidir.

### 1.1.2.2. Periferik sinir

Periferik sinir, merkezi sinir sistemini vücudun diğer organlarına bağlar. Bunlar kranial sinirler ve spinal sinirlerdir; (beynin on iki kranial sinir çifti, trent ve bir çift spinal sinir) (Schmidt ve Leach, 2003). İnsanlarda omurilik sinirlerinin en önemlisi, pelvisten dizin üstüne kadar uzanan siyatik sinirdir (Dinis, 2014). Nöronlar ile efektörleri arasında sinir dürtüleri şeklinde oluşturulan bilgiler bu sinirlerden iletilir.

CNS demetleri olarak da adlandırılan periferik sinirler, miyelinli veya miyelinli olmayan aksonlardan oluşan bir dizi sinir lifini temsil eder (Seigneurin ve Boutonnat, 2012). Bu sinir fiberleri fasiküller (sinir iplikleri demeti) halinde gruplanır. Bir sinir 100'e kadar fasikül içerebilir (Antoine, 1999). Aslında, her bir sinir lifi, endoneuron adı verilen bir bağ dokusu ile çevrilidir. Sinirin fasikülü, ayrıca, sinirlere gerilmeye karşı çok büyük bir direnç kazandıran, kollajen fiberlerinden, fibronektinlerden ve mikro-iplikçiklerden oluşan fibroblastik kökenli perinöral hücrelerin katmanlarından oluşan perineurium adı verilen başka bir bağ dokusu ile sınırlıdır. Epineurium, tüm sinir ipleri demetlerini bir araya toplayan sinirin en dıştaki bağ dokusu zarfını temsil eder (Dinis, 2014). Bir yaralanmadan etkilenen fasikül tipi sinir lezyonunun derecesini belirler. Şekil 1.2, periferik sinirin şematik yapısını göstermektedir.



**Şekil 1.2.** Periferik siniri oluşturan tüm fasikülleri (sinir ipleri demeti) temsil eden periferik sinirin şematik yapısı (Marieb, 2006).

### 1.1.2.3. Sinir Yaralanması

Travmatik beyin hasarı, önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Tu, 2017). Sinir lezyonları çeşitli kazalar, düşmeler, spor aktiviteleri ve hastalıklar karşısında sık görülür. Periferik sinir hasarı; enfeksiyonlar, travma, metabolik anormallikler, ışınlama, nörotoksin, kalıtsal nörodejenerasyon, inflamasyon veya tümör infiltrasyonundan kaynaklanabilir (Dworkin, 2003). Hastalar, motor becerilerle ilgili problemler de dahil olmak üzere, bu lezyonların neden olduğu diğer sağlık sorunlarından muzdariptirler. Üstelik bir tedavisi de çok pahalıdır.

Dünya Sağlık Örgütü istatistiklerine göre, dünya genelinde her yıl 10 ila 15 milyon yeni yaralanma vakası bildiriliyor ve bunun % 15 ila 40'ı periferik sinir hasarına bağlıdır. Çin'de, her yıl yaklaşık, yarısı sinir nakli gerektiren 600.000 ila 900.000 arasında yeni periferik sinir hasarı vakası bildirilmektedir (Chen ve ark., 2015). Merkezi sinir sistemini etkileyen lezyonlar ayrıca hücre ölümüne neden olur ve bir dizi hücrel rahatsızlığı aktive edebilir (Stabenfeldt, Garcı ve Laplaca, 2006).

### 1.1.2.4. Sinir Yaralanmalarının Sınıflandırılması

1943'te Seddon, sinir hasarını Nöropraksi, Aksonotmezisve Nörotmezis olmak üzere üç tipe sınıflandırmıştır (Seddon, 1943). Sinir lezyonlarının bir başka sınıflandırması, Sunderland'in 1951'deki sınıflandırmasıdır. Sunderland'in sınıflandırması Seddon'ın sınıflandırmasından daha detaylıdır (Sunderland, 1951) . Sunderland'a göre yaralanma tipleri:

- a) Nöropraksi
- b)Aksonotmezis: tip II lezyonları
- c)Aksonotmezis: tip III lezyonları
- d)Aksonotmezis: tip I V lezyonları
- e)Nörotmezis

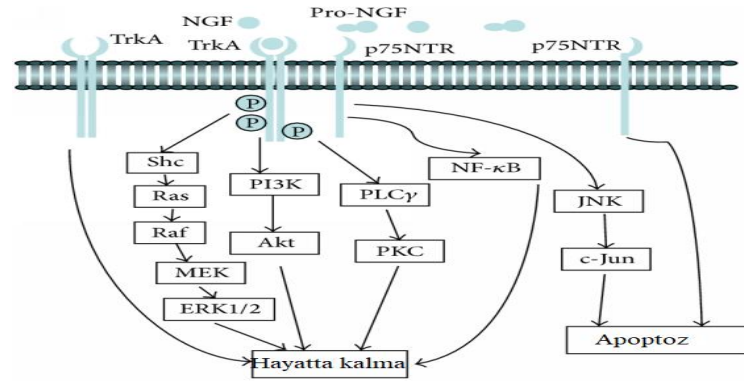
### 1.1.2.5. Sinir büyüme faktörü (NGF) ve sinir onarımı

1950'de Rita Levi-Montalcini tarafından keşfedilen NGF, nörotrofinler olarak da bilinen faktörler ailesine aittir (Cowan, 2001). NGF, nöronların gelişmesinde , hayatta kalmasında ve nöral hücrelerin yenilenmesinde önemli bir rol oynar (Aloe ve ark., 2015). NGF ve reseptörleri yetişkin yaşamı boyunca ve yaşlanma sırasında mast hücreleri, ve lenfositler gibi birçok hücre tarafından üretilir (Bonini, 2003). Fakat daha yüksek NGF miktarı, mevcut en büyük ve en iyi NGF sentezi kaynağını temsil eden yetişkin erkek farelerin tükürük bezlerinde üretilir (Cohen, 1960).

Sinir büyüme faktörü (NGF) kültürlü primer nöronlarda, nöronal apoptozu önler ve nörodejeneratif hastalıkların hayvan modellerinde nöronal dejenerasyonu azaltır. NGF'nin güçlü bir anti-apoptotik etkiye sahip olduğu, NGF'nin yoksun bırakılmasıyla nöronların bir dizi morfolojik değişiklik gösterdiği ve nihayetinde apoptoz geçirdiği bulunmuştur (Deckwerth, 1993).

İn vitro olarak, sıçan feokromositoma PC12 hücre hattı, NGF'nin nöronal hücreler üzerindeki biyolojik etkilerini incelemek için yaygın bir şekilde bir model sistem olarak kullanılır (Koike, 1992). PC12 hücreleri, sinir büyüme faktörüne (NGF) maruz kaldıklarında sempatik nöronlara farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Böylece sempatik nöronun fenotipinde ve özelliklerinde gözlenebilir bir değişiklik sergilerler (Hu ve arkadaşları, 2017).

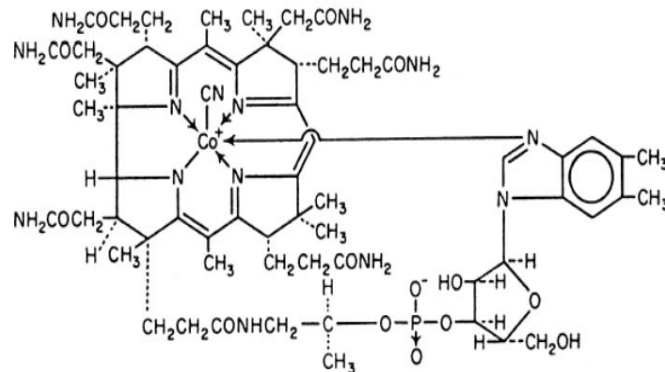
Bir NGF reseptörü olan P75NTR, düşük afiniteli bir reseptördür. TrkA ise, NGF için katalitik olarak yüksek affiniteli aktif bir reseptördür. NGF'nin TrkA'ya bağlanması, TrkA'nın fosforilasyonuna ve sonuçta apoptozun önlenmesi veya hücre canlılığının iyileşmesi gibi farklı biyolojik fonksiyonlara yol açan birkaç sinyal yolunun aktivasyonuna neden olur (Wang ve diğerleri, 2014). Şekil 1.3 de, NGF reseptörlerinin sinyalizasyonu görülmektedir. NGF, NGF'nin öncü protein formu olan Pro-NGF'den ayrılma yoluyla oluşturulur. NGF'nin TrkA'ya bağlanması, TrkA'nın fosforilasyonuna ve PI3K / Akt, Ras / Raf / MEK / ERK1 / 2 veya PLC / PKC sinyal yolağı gibi çeşitli sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur. Diğer NGF reseptörü, p75NTR, düşük afiniteli bir reseptördür. P75NTR'nin kesin rolü hücre içi içeriğe bağlıdır. NF-B yolu ile hücre canlılığını artırabilir veya JNK / c-Jun sinyal yolu ile hücre ölümüne neden olabilir (Wang et al., 2014).



Şekil 1.3. NGF reseptörlerinin sinyalizasyonu (Wang ve ark., 2014)

Günümüzde cerrahi implantlarda, polimer nanofiberlere eklenen NGF, hasarlı sinirlerin onarımı için daha ümit verici bir terapötik araç haline gelmiştir.

#### 1.1.2.6. B12 vitamininin (Siyanokobalamin) sinir hasarına etkisi



Şekil 1.4. B12 vitamini yapısal şeması (siyanokobalamin)

Siyanokobalamin (5,6-dimetilbenzimidazol-siyanokobalamin), eşdeğer B12 aktivitesine sahip B12 vitamininin sentetik bir şeklidir. Hematopoez ve sinir sistemi fonksiyonları da dâhil olmak üzere birçok hüresel metabolizmada kilit rol oynayan bir vitamindir (Gröber, Kisters ve Schmidt, 2013).

Periferik sinir hasarı sonrası nöronal hücrelerin aksonal büyümesini destekleme kabiliyetinden dolayı, B12 vitamini periferik sinir hasarının tedavisinde klinik olarak kullanılan bir ürün haline gelmektedir (Wu ve ark. 2019). Bu nedenle, hibrit biyoaktif cam nanofiberlere (PCL/BC), B12 vitamini (siyanokobalamin) ekledik ve B12 vitamini bulunmayan hibrit cam nanofiberlerle kıyaslayarak PC12 hücreleri üzerindeki etkisini inceledik.

## 1.2. SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOMATERYALLER

Yaralı sinirin daha iyi rejeneratif tedavisi için, bilim adamları hücre dışı matris benzer biyobozunur polimer malzemeler kullanırlar. Bu biyomalzemeler, hücre büyümesini ve nihayetinde doku rejenerasyonunu teşvik etmek için doğal hücre dışı matris homolog olan bir mimari çerçeve sağlamak üzere tasarlanmıştır (Lee ve ark.,2013). Büyük hasar sonucu 1 mm/gün yeniden aksonal büyümeye rağmen, yaralanan sinir 6 mm'den büyük sinir hasarı için yenilenemez (Aggarwal et Kumar 2016). Bu nedenle, kaybedilen tüm yeteneklerini yeniden kazanması için sinirin yönlendirilmesi gerekir. Yaygın olarak kullanılan teknik, “sinir hasarının onarımı için altın standart” olarak da adlandırılan otolog sinir naklidir (Sulaiman, 2006).

Doku mühendisliğinin farklı ihtiyaçlarını karşılamak için, araştırmacılar cerrahi implantasyonlar için metaller, seramikler ve polimerler gibi çok çeşitli biyoyumlu malzemelerden yararlanmışlardır. Tipik implant metalleri (paslanmaz çelikler, kobalt bazlı alaşımlar ve titanyum bazlı alaşımlar) ve kullanılan seramikler (alümina, zirkonya ve kalsiyum fosfat) doku mühendisliği uygulamaları için uygun değildir. Çünkü biyolojik olarak parçalanamazlar. Ayrıca,  $\alpha$ -trikalsiyum fosfat ve  $\beta$ -trikalsiyum fosfatın işlenebilirliği çok sınırlıdır (Maquet ve Jerome, 1997).

Kullanılan polimer türü, iskele üretimi için sentetik, doğal veya harmanlanmış olsun, hasarlı sinir dokusunu restore etmede önemli bir işleve sahiptir (Boni ve ark. 2018). İdeal bir biyomateryal için istenen özellikler, özellikle toksik olmama, biyoyumluluk ve biyobozunurluktur.

### 1.2.1. Doğal Polimerler

İnsan vücudunun makromoleküllere olan benzerlikleri nedeniyle, doğal polimerler biyolojik çevre tarafından tanınır ve kabul edilir (Vasita ve Katti, 2006). Vücuttaki implantasyon sırasında sitotoksikite ve immünojenik reaksiyon riskini büyük ölçüde azaltırlar (Boni ve ark., 2018). Rejenerasyon sırasında hücre göçünün kolaylığı, büyümesi ve organizasyonu gibi diğer avantajların tümü, bu polimerlerin rejeneratif tıpta kullanılmasına neden olur (Nezarati, 2014). Kullanımları, yüksek biyoyumlulukları ve doğal biyolojik bozunma kinetiği nedeniyle çok faydalıdır. Nöronal doku mühendisliğinde, doğal polimerler, matris şekillendiriciler, jelleştirici maddeler veya ilaç salma düzenleyicileri dahil olmak üzere çeşitli rolleri yerine getirebilir ve omurilik gibi

zor bir fizyolojik geometri kusurunu barındıracak şekilde kolayca ayarlanabilirler (Madigan ve ark., 2009).

Nöronal doku mühendisliğinde iskele yapımında sıklıkla kullanılan doğal polimerler şunlardır: kollajen, jelatin, hyaluronik asit, kitosan, kitin, elastin ve aljinat (Sensharma ve diğerleri, 2017). Kolajen insan vücudunda en bol , (Bhattarai ve ark. 2018) ve özellikle çeşitli bağ dokularının doğal hücre dışı matrisinde büyük miktarlarda bulunan bir bileşendir (Ma, 2004). İnsanlarda, kollajen üst ailesinde 28 protein vardır, ancak en yaygın olanı tip I, kemikler ve cilt, tendonlar, kıkırdak ve vücut dahil olmak üzere tüm vücut için yapı ve destek sağlayan bağ dokusunun ana bileşeni olan fibril kollajendir(Cen ve ark.,2008). Genellikle sığır tendonundan çıkarılan Tip I kolajenleri, iyi mekanik özelliklere sahip biyolojik olarak uyumlu iskelelerdir (Oliveira ve diğerleri, 2010). Ancak iskeleler tamamen kollajenden yapıldığı zaman, mekanik dayanımı zayıf ve kullanımı zordur (Tateishi ve Chen, 2005).

Hiyaluronik asit (HA), insan vücudunun çeşitli bölümlerinin hücre dışı dokularında bulunan ve yağlanmada önemli bir rol oynayan yapışkan olmayan bir glikozaminoglikandır (Boni ve diğerleri, 2018). Esas olarak bağ dokularında bulunan biyobozunur bir doğal malzemedir ( Chircov et al.,2018). HA, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu, biyo resorbe edilebildiği ve hidrojel oluşturma kabiliyeti olması nedeniyle tercih edilen bir malzemedir ( Chircov et al.,2018).Beyindeki ECM'deki varlığı nedeniyle, hiyaluronik asit, CNS'nin doku mühendisliği için ideal bir seçim haline gelmiştir. HA iskeleleri sert ve yumuşak dokuların yenilenmesinde kullanılır (Stratton ve ark., 2016). Doğal malzemelerin biyouyumluluğunu geliştirme, toksik etkileri azaltma ve Schwann hücreleri gibi destek hücrelerinin göçünü iyileştirme özellikleriyle bilinmektedirler.

Doğal polimerler, özellikle hasarlı sinirin onarımını iyileştirme kabiliyetine rağmen, yaralanma sonrası rejenerasyonun zor görüldüğü sinir doku mühendisliği için özel özelliklere sahiptir. Bu doğal materyaller, ideal olmalarına rağmen bazen istenmeyen bağışıklık tepkileri, bağışıklık baskılayıcı ilaçların potansiyel kullanımı gibi bazı dezavantajlara sahiptirler (Lee et al., 2013).

Araştırmacılar, doku polimeri olarak kullanılan doğal polimerlerin eksikliklerini gidermek için, sentetik polimerler olarak bilinen diğer uygun polimer türlerinden de faydalanmışlardır.

### 1.2.2. Sentetik Polimerler

Son on yılda, bilimsel araştırmacılar, belirli bir uygulama için optimize edilebilecek kimyasal ve fiziksel özellikleri (bozunma hızı, gözeneklilik, mekanik direnç) nedeniyle sentetik malzemelerle daha fazla ilgileniyorlar (Schmidt ve Leach, 2003). Doğal polimerler tarafından ortaya çıkan kusurlar, daha güvenilir özelliklere sahip sentetik polimerlerin gelişmesine yol açmıştır. (Lee ve ark., 2013). Böylece sentetik polimerler, kompleks kimyasal yapılarının, termal hassasiyetlerinin yanı sıra işlem zorluklarının etkinliğini engellediği doğal biyomalzemelerin aksine, daha iyi bir mekanik özelliğe sahiptir (Boni ve ark., 2018). Farklı üretim biçimlerinin yanı sıra doku büyümesini teşvik eden gözeneklerin istenen morfolojik özellikleri nedeniyle de dikkatçekicidirler. Ek olarak, bu polimerler doku büyümesini indükleyebilecek kimyasal fonksiyonel gruplar ile tasarlanabilir. Biyolojik olarak atıl ve parçalanamayan silikon, sinir modeli için kullanılan ilk sentetik malzemedir.

Daha sonra, alifatik polyesterler, polifosforlar, poliüretanlar, piezoelektrik polimerler ve bazı elektro-iletken polimerler dahil olmak üzere diğer biyolojik olarak çözünebilir sentetik polimer sınıfları, nöronal dokuların mühendisliğinde iskele biyomateryalleri olarak kullanılmıştır (Gu X, ve ark ., 2014). Ancak, biyomedikal alanında en çok kullanılanlar polyesterlerdir. Poli glikolik asit (PGA), poli laktik asit (PLA) ve poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) gibi bu polyesterler tıbbi alanda aranan biyomateryellerdir (Eap, 2014). Şimdiye kadar, kullanılabilirliği, biyoyumluluğu, işleme kolaylığı, optimum mekanik özellikler ve FDA onayı nedeniyle en çok kullanılanlar arasındadır. PLA ve PGA, sırasıyla laktik veya glikolik asit polyester bağları ile karakterize edilen biyobozunur termoplastik polimerlerdir (Boni ve diğerleri, 2018). PGA, yüksek kristalli, ancak hızla bozulan ve mekanik bütünlüğünü 2 ila 4 hafta arasında kaybeden hidrofilik bir polimerdir (Song vd., 2018). PLA (Polilaktik Asit), yüksek biyoyumluluk nedeniyle doku mühendisliğinde tercih edilmektedir (Verdonck, 2018). Doku mühendisliğinde kullanılan PLA iskeleleri, akson uzamasına ve büyümelerini desteklemesine izin vererek Schwann hücreleri için destek sağlamaktadırlar. Ancak yapısal kararsızlıkları nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadırlar (Boni ve ark., 2018).

PLGA, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asitin (PGA) bir kopolimeridir. Nöral doku mühendisliğinde kullanılan biyobozunur, amorf ve toksik olmayan bir polyesterdir (Sensharma ve ark., 2017).

PLA ve PGA'ya kıyasla da tercih edilir. Çünkü parçalanabilirliği monomerleri (laktid / glikolid) arasındaki oran değiştirilerek kolayca kontrol edilebilir (Song vd., 2018). Bununla birlikte, PLGA bozulma sırasında asidik ürünler salgılar ve bu da aseptik iltihaplanmaya neden olabilen doku pH'ında bir azalmaya neden olur (Sensharma ve diğerleri, 2017).

PCL doku mühendisliği için iskele imalatında yaygın olarak kullanılan polyester bir malzemedir. Sentezi 1930'larda başlamış ve bugüne kadar polilakton grubunun en çok çalışılan maddesi olmuştur (Stratton ve ark., 2016). Erime sıcaklığı 59 - 64 ° C olan yarı kristalli bir polimerdir ve yaklaşık -60 ° C olan çok düşük bir cam geçiş sıcaklığına sahiptir. Polikaprolakton (PCL), ε-kaprolakton siklik monomerinin halka açma polimerizasyonu ile sentezlenen bir polyesterdir (Sinha ve ark., 2004). Uzun süreli implantlar için çok yavaş bozunması nedeniyle (2 ila 3 yıl) ideal bir malzemedir (Nezarati, 2014). Düşük ekonomik maliyeti, toksik olmaması ve yüksek çözünürlüğü PCL'yi, sinirsel rejenerasyon ile ilgili önemli bir rol oynayacağını düşündüğümüz doku iskelesi için tasarlanmış bir model malzeme olarak, tez çalışmamızda seçmemize neden oldu.

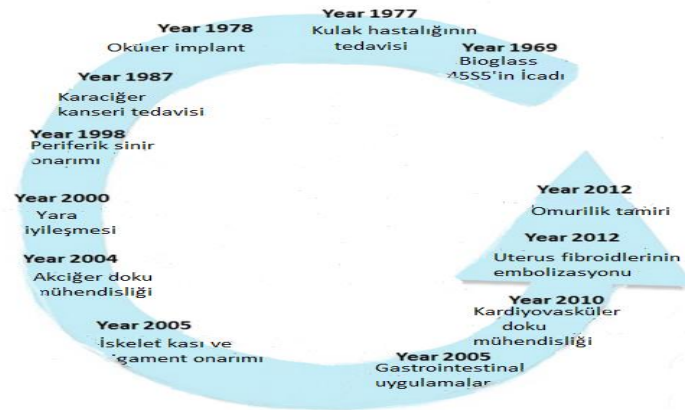
### 1.2.3. Biyoaktif Cam

Biyoaktif camlar, doku onarımı için rejeneratif tıpta kullanılabilecek bir dizi biyolojik olarak aktif kimyasal molekül sunar. Bu camlar, biyoaktiviteleri, hücresel doku ile in vitro ve in vivo temasta biyoyumluluğu uyarmaları, inflamatuvar ve toksik süreçlerin yokluğu nedeniyle tercih edilmektedirler (Bachar, 2012). İlk biyoaktif cam, 1969'da Florida Üniversitesi'nde Larry L. Hench tarafından keşfedildi. Bu, 45S5 biyocam, Bioglass® (% 45 SiO<sub>2</sub>, % 24.5 Na<sub>2</sub>O, % 24.5 CaO ve % 6 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 'dir (Hench, 2006). Bu çalışmanın başlangıcında, biyocamla öncelikle kemik kusurlarını gidermek amaçlanıyordu. Biyoaktif cam ilk olarak sağır bir hastada enfeksiyondan sonra orta kulak kemiğini iyileştirmek için uygulandı. 45S5 biyoaktif camın, az deforme olmuş orta kulak kemiklerini geri kazandırabildiği görülmüştür (Hench, 2006). Aynı orijinal biyo-cam (45S5), bir milyondan fazla hastada çene ve ortopedideki kemik kusurlarını onarmak için kullanılmıştır (Hench, 2006).

Başlangıçta, biyoaktif camların klinik uygulamaları yalnızca kemik onarımı ile sınırlıydı. Sadece otoloji, ortopedi ve diş hekimliğinde uygulanabilir oldukları düşünülüyordu. Günümüzde, biyoaktif camlar, doku mühendisliği ve terapötiklerde

yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, kemik dokusu mühendisliğinin yanı sıra, biyoaktif camlar, nöromusküler dokular, epitelyal ve kardiyak dokular, gastrik ülserlerin tedavisi ve kemik dışı kanserlerin tedavisi gibi diğer dokuların tamirinde de uygun bir şekilde yer almaktadır (Baino ve ark. , 2016). Şekil 1.5 de, biyoaktif camın kemik dokusu mühendisliği dışında klinik kullanımının tarihçesi verilmektedir.

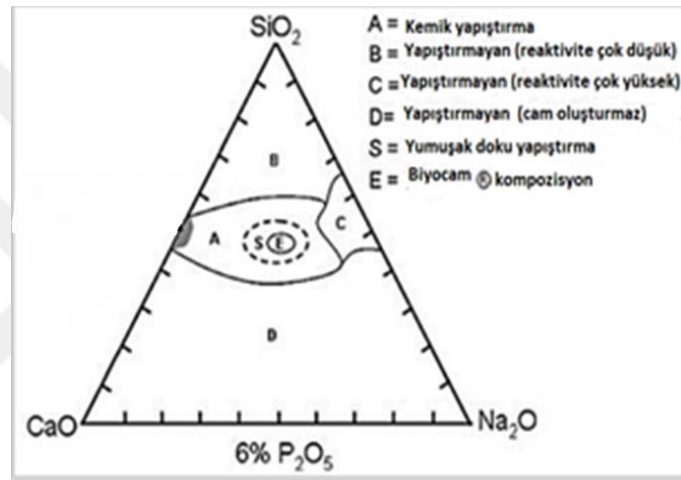
Camın doku mühendisliğinde klinik olarak ilgisi üzerine yapılan birkaç araştırmadan sonra, üç biyoaktif cam grubu geliştirilmiştir. Bunlar  $B_2O_3$  (borat) bazlı,  $P_2O_5$  (fosfat) bazlı ve  $SiO_2$  (silikat) bazlı camlardır. Ek olarak, cam bileşimi malzemeye belirli özelliklere sahip başka kimyasal bileşiklerin eklenmesiyle geliştirilebilir. Örneğin, biyolojik bir ortamda yüzey reaktivitesini ayarlamak için cama  $CaO$ ,  $K_2O$ ,  $Na_2O$  ve  $MgO$  eklenmiştir. Ayrıca,  $ZnO$ ,  $CuO$  ve  $Ag_2O$  antibakteriyel özellikleri ile uygun iyonların salınmasına izin verirler (Baino ve diğ., 2016). Vücutla temas ettikten sonra, bu biyoaktif camlar vücut sıvısıyla reaksiyona girer ve biyocam bileşimine bağlı olarak, salınan iyonlar farklı roller oynar ve hücrelere sinyal verir (Miguez-pacheco, 2015).



Şekil 1.5. Biyoaktif camların iskelet sistemi dışındaki uygulamalarının kronolojisi (Baino ve ark., 2016).

Doku türüne ve onarılacak koşullara göre farklı tipte biyoaktif camlar çalışılmıştır. 1969-71 yılları arasında, Larry L. Hench, tamir edilecek doku tipine göre cam bileşiminin açıklamalarını veren bir  $Na_2O-CaO-SiO_2$  diyagramı oluşturmuştur (şekil 1.6). Bu diyagram, cam bileşimleri ve bu biyoaktif camların dokularla oluşturabileceği bağların tiplerini açıklamaktadır. En önemli bileşen, silikadır. Çünkü miktarı, biyoaktif cam ve doku arasındaki bağı belirler. Genel olarak, % 60  $SiO_2$  (kütle olarak) bağlanma sınırını temsil eder. Çünkü bu değerin ötesinde cam dokuya bağlanamaz. Daha yavaş bir

yapışma oranına sahip olan bileşimler, camda kütlece % 52 ila % 60  $\text{SiO}_2$ 'dir. % 60'dan daha büyük  $\text{SiO}_2$  (bölge B) içeren bileşimler dokulara bağlanmaz ve biyolojik olarak etkisizdir. A bölgesi için, tüm bileşimler biyoaktiftir ve bir bağlantı oluşturur. Sadece hızlı reaksiyona giren cam bileşimler yumuşak doku bağı oluşturur (S bölgesi). Cam bileşimi kütlece % 52  $\text{SiO}_2$ 'yi aştığında, cam kemiğe bağlanır, fakat yumuşak dokuya bağlanmaz (Hench, 2006). E bölgesi ( $\text{Na}_2\text{O}$ - $\text{CaO}$ - $\text{SiO}_2$  diyagramının ortası), cam yumuşak dokuya bağlanır. C Bölgesi emilebilir camlardır ve implantasyondan sonraki 10 ila 30 gün içinde kaybolma eğilimindedir. D bölgesinde bulunan kompozisyonlar teknik olarak uygun değildir ve asla implante edilmemiştir (Hench, 2001).



Şekil 1.6. Biyoaktif camların yumuşak dokuya ve kemiğe bağlanmasının bileşime bağlılığı (% kütlece) (Hench, 2001)

### 1.3. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE İSKELE

Biyomalzemeler, hasar görmüş dokunun yeniden oluşturulmasına yardımcı olmak veya ilaçların dağıtımını kolaylaştırmak için iskele imalatında kullanılır. İskele, hücrelerin ve büyüme faktörlerinin yaralanma bölgesine daha yakın hareket etmelerine ve iyileşmeyi kolaylaştırmaya izin veren bir araçtır (Gabay, Sanchez ve Taboas, 2010).

Başarılı bir sinir rejenerasyonu, iskeleler, hücreler ve biyokimyasal ve / veya mekanik uyarınları içeren merkezi elemanların kullanılmasını gerektirir (Dahlin ve ark., 2011).

#### 1.3.1. İskele mimarisi

Doku mühendisliğinde çeşitli malzemelerden iskele olarak yararlanılmıştır. Ancak polimerik iskeleler doku büyümesini destekleme özelliklerinden ve biyoaktif faktörlerin salınımı için taşıyıcı olarak iş gördüklerinden dolayı sık kullanılır (Dahlin ve ark., 2011). Doku mühendisliğinde kullanılan iskeleler, implante edilecekleri vücut üzerinde olumsuz bir etkisi olmayan biyobozunur polimerlerden yapılır. Polimerik nanofiberler, 1 ile 1000 nm arasında değişen bir çapa sahiptir (Kumbar ve ark., 2006).

Hasarlı doku bölgesine yerleştirilen bu iskeleler, neo-doku oluşumunu desteklemektedirler (Nezarati, 2014). Bu iskeleler, hücre bağlanması için yapısal destek görevi görürler ve hücre çoğalması ve doku gelişimi için uygun bir ortam sağlarlar. Ayrıca, hücre dışı yapay bir matris olarak tasarlanan bu iskeleler, neo-hücrel doku oluşumu için uygun bir ortam sağlayabilen etkili mimari, mekanik, fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olmalıdır.

İdeal bir iskele aşağıdaki beş spesifik özellikle nitelenir:

- 1) Gözeneklilik: Hücre göçünü ve besin difüzyonunu kolaylaştırmak ve implantasyon sırasında anjiyogenez ve metabolik değişimi teşvik etmek için gözenekli bir yapıya ihtiyaç vardır.
- 2) Olumlu mekanik özellikler: İskeleler, yerine koymak için hasarlı kumaşınkilere benzer iyi mekanik özelliklere sahip olmalıdır.
- 3) Biyouyumluluk ve biyobozunurluk: Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta iskele implantlarında toksisite olmayan ve neo-doku oluşum oranına karşılık gelen düşük bir bozulma oranı aranır.
- 4) İskeleler düşük immünojenliğe sahip olmalıdır.

5) İskele, hücrenin fenotipini etkileyen ve yönlendirilmiş hücre büyümesini teşvik eden biyolojik ve / veya fiziksel sinyalleri içerebilmelidir (Chan ve Leong, 2008).

### 1.3.2. İskele üretim teknikleri

Son on yılda, doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve biyomimetik yapı iskelelerinin inşası için çeşitli üretim süreçleri geliştirilmiştir (Lu, Li ve Chen, 2013). Nanoyapılı yapı iskelelerinin tasarımı için kendinden montaj, faz ayırma, elektroçürme ve diğer üretim teknikleri kullanılır. Bu iskeleler, aksonal büyümeyi iyileştirmek için tasarlanmıştır (Gu X ve diğ., 2014).

#### 1.3.2.1. Kendiliğinden montaj tekniği

Kendiliğinden montaj tekniği, kovalent olmayan bağlar veya zayıf kovalent etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar veya diğerleri tarafından indüklenen biyolojik moleküllerin montajına dayanan, nano elyaf üretimi için kullanılan bir tekniktir (Lu, Li ve Chen, 2013). Proteinler, peptitler ve nükleik asitler gibi küçük moleküller, nano lifler oluşturmak için zayıf kovalent olmayan etkileşimlerle birleşir. Bu teknik tavsiye edilmez; çünkü karmaşık bir tekniktir. Ayrıca, sadece uzunluğu bir ila birkaç mikron olan kısa fiberler elde edilebilir (Dahlin et al., 2011).

#### 1.3.2.2. Faz ayırma

Faz ayırma, polimer membranlar ve gözenekli iskeleler oluşturmak için kullanılan daha eski bir yöntemdir. İşlem, bir polimer çözeltisini, polimer açısından fakir bir faza ve polimer açısından zengin bir faza ayırarak yapılır. Teknik, özel ekipman gerektirmediği için basit görünmesine rağmen, yalnızca sınırlı sayıda polimerle yapılabilir ve ticari bir yapılandırmaya adapte etmek zor olabilir (Dahlin ve ark., 2011).

#### 1.3.2.3. Elektroçürme

Elektroçürme yöntemi, 1930'lardan bu yana kullanılan bir fiber çürme işlemidir (Formhals, 1934). Bu, yüksek potansiyelli bir elektrik alanı kullanarak bir çözelti veya polimer kütesinin daha küçük çaplı elyaflara döndürülmesi için kullanılan bir tekniktir

(Subbiah ve diğeri, 2004). Elektroğirme ile mikro ile nanometrik boyutta, oldukça gözenekli fiber üretilebilir (Nezarati, 2014).

Malzeme eğirmenin birkaç yöntemi vardır. Ancak elektroğirme, rastgele ve nano ölçekte hızlı fiber veren en çekici üretim yöntemi olmaya devam etmektedir (Rajput, 2012). Bu yaklaşım için; gerilim, iğnenin ucu ile plaka toplayıcı arasındaki mesafe, akış hızı ve çözelti konsantrasyonu gibi üretim parametreleri çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Bu teknikte kullanılan parametreler, daha iyi özellikte nano fiberler elde edebilmek için değiştirilebilir ve optimize edilebilir.

Elektroğirme tekniği ilk olarak 1897'de Rayleigh tarafından çalışılmış, daha sonra 1914'te Zeleny tarafından ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Rajput, 2012). Bu işlemin ilk kez Formhals tarafından patenti alınmıştır (Formhals, 1934). Formhals, ilk kez bir elektrik alanı kullanan eğirme işlemi ve aparatını icat etmiştir. İlk sentezlenen fiberler, çözücü olarak aseton kullanan selüloz asetat fiberleridir. Formhals'ın elektroğirme tekniği ile hizalanmış fiberler üretilmiştir. Ancak, iplikçilikten sonra fiberlerin tamamen kurutulması zorluğu nedeniyle bu teknik dezavantajlıdır. Daha sonra, 1969'da Taylor, elektrik alanı uygulayarak, iğnenin ucunda üretilen polimer damlacıkları incelemiştir. (Subbiah ve diğeri, 2005).

Elektroğirme tekniği, son on yılda doku mühendisliği iskeleleri için polimerleri mikro veya nanometre ölçekli fibröz dokuya dönüştürmek için yenilenmiştir (Ma, 2004). Özellikle 1990'lı yılların ortalarında, bu tekniğin, bir çok tıbbi alanda kullanımını önemli hale gelmişti (Nezarati, 2014).

Fiber üretimi için birkaç yöntem vardır, ancak elektroğirme, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp topluluğu tarafından nanofiber üretimi için uygun bir teknik olarak kabul edilen yöntemdir (Feltz ve ark., 2017). Teknik sadeliği ve adaptasyon kolaylığı nedeniyle diğer eğirme yöntemlerinden çok daha avantajlıdır.

Elektroğirme işleminde kullanılacak polimer çözeltiyi hazırlamak için sol-gel yöntemi kullanılabilir.

### **1.3.2.3.1. Sol-jel yöntemi**

Sol-jel teknolojisi, inorganik bir polimerizasyon işlemidir. Polikondenzasyon reaksiyonları ile sıvı halden jel haline geçiş 1800'lerde başlamıştır. "Sol-jel" terimi, ilk kez 1864 yılında silisli topraklar üzerindeki çalışmalarını sırasında Graham tarafından icat edilmiştir (Graham, 1864). Solüsyonlardan camlar, seramikler, ince filmler ve fiberler

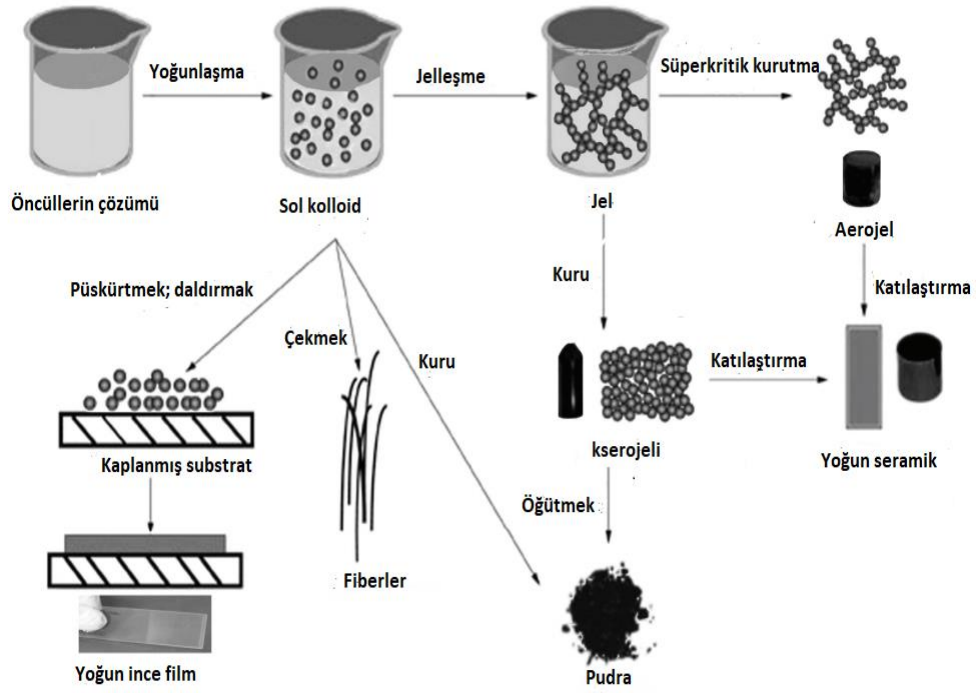
elde etmek için kullanılan bir tekniktir (Owens ve ark., 2016). Aslında, ılımlı kimyasal koşullar altında, inorganik bileşiklerin ve cam gibi organik-inorganik hibritlerin bir sentez yöntemidir. İşlem, ortam sıcaklığına yakın düşük sıcaklıklarda hidroliz ve yoğunlaşma reaksiyonları ile karakterize edildiği için yumuşak kimya olarak adlandırılır (Znaidi, 2010).

Sol-jel tekniği ile çeşitli şekillerde nanopartiküller üretilir. Sentezlenen ürünün sol-jel yöntemiyle kontrol edilebilmesi, tekniği çok avantajlı kılar ve biyomedikal alanda kullanımını genişletir (Toygun, Köneçoğlu ve Kalpaklı, 2013).

Silisyum alkoksitin öncül solüsyonlarından (en çok kullanılan TEOS'tur), yoğunlaşmadan sonra bir "sol" oluşur."Sol", sıvı halde olan, genellikle kolloidal parçacıklara sahip ve farklı monomerlerin bir karışımının dağılımından oluşan bir çözeltilidir. Elde edilen kolloidal çözelti doğrudan nano fiberlerin sentezi için kullanılır.

TEOS, asidik koşullar altında ve silis camlarının oluşumu için sulu ortamda hidrolize olma kabiliyeti sayesinde en yaygın kullanılan silisyum alkoksit çözeltilidir. Sol-gel yöntemiyle sentezlenen bu silika bazlı biyoaktif camlar (BC'ler), yumuşak ve sert dokuların yenilenmesini destekleyen yüksek biyo-uyumlu malzemeler olarak bilinmektedir (Owens ve diğ., 2016).

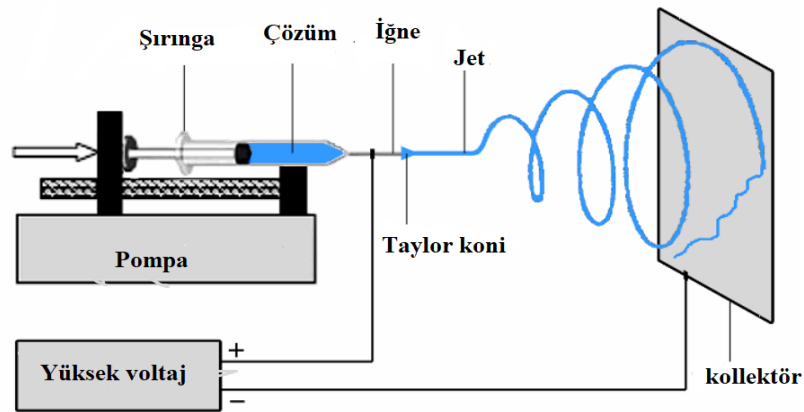
Elde edilen kolloidal çözelti, elektroegirme yöntemiyle fiberlerin oluşumunda doğrudan kullanılabilir veya daha sonra ince ve yoğun filmler oluşturmak için başka reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Sol, daha sonra yoğun seramik veya toz nanoparçacıkların üretimi için kullanılan bir jel oluşturmak üzere yoğunlaşır. Şekil 1.7'de sol-jel işleminin şeması görülmektedir.



Şekil 1.7. Sol-jel işleminin şeması (Michelina ve Flavia, 2012).

### 1.3.2.3.2. Elektroçizme Aparatı

Basit bir yapı aparatıdır (Subbiah ve ark. 2004) ve esas olarak dört bölümden oluşur: bir şırınga pompası (cam şırınga polimer çözeltisini içerir), bir metal iğne, bir güç kaynağı ve bir metal toplayıcı (şekil 1.8).



Şekil 1. 8. Elektroçizme cihazının şeması (Yi ve ark., 2017).

Elektroeğirme işlemi sırasında, polimer çözeltisi iğnenin içinden çıkarılır ve enjeksiyon, şırınga pompası tarafından kontrol edilir. Uygulanan voltaj (5 ila 30 kV arasında), iğnenin ucundaki sıvı damlasının yüzey yükü yoğunluğunda koni şeklinde (Taylor konisi) bir artış sağlar. Filament, spiral ilmek şeklinde dışarı atılır ve enjeksiyon sırasında toplayıcıya ulaşmadan önce uzar. Bu nedenle çap azalır ve çözücü buharlaşır (Mele, 2016). Jet plaka toplayıcısına yükseldiğinde, çözücü buharlaşır ve fiber oluşumu meydana gelir (Lu, Li ve Chen, 2013).

### **1.3.2.3.3. Elektroeğirme parametreleri**

Elektroeğirme işlemi, çözüm parametreleri, işlem parametreleri ve ortam parametreleri dâhil olmak üzere çeşitli parametrelerden etkilenir. İşlemin parametreleri: uygulanan elektrik alanı, iğne ile toplayıcı arasındaki mesafe, akış ve iğnenin çapı. Çözücü parametreleri ise; çözücü tipi, polimer konsantrasyonu ve çözeltinin viskozitesini içerir. Ortam parametreleri nem ve sıcaklığı içerir (Haider, 2015). Bununla birlikte, daha kaliteli bir nanofiber elde etmek için, bu elektroegirme parametrelerinin optimize edilmesi gereklidir. Çünkü bu parametrelerin fiberlerin morfolojisi üzerinde büyük etkisi vardır.

#### **1.3.2.3.3.1. Uygulanan voltajın etkisi**

Uygulanan voltajın nanofiberlerin morfolojisini etkilediği bulunmuştur. Uygulanan voltaj ne kadar yüksek olursa, nanofiberlerin çapı o kadar küçüktür. Yüksek gerilim, boncuk oluşumuyla birlikte dar çaplı fiberlerle sonuçlanır (Rajput, 2012). 2001'de Deitzel ve ark, elektroegirilmiş PEO (polietilen oksit) nanofiberler ile yaptığı deneyde, test edilen fiberlerin 5,5 kV voltajda eğirme kusurları olmadan dümdüz olduğunu bulmuşlardır. Gerilimi 9,0 kV'a çıkararak, fiberde yüksek yoğunlukta boncuklar gözlemişlerdir (Deitzel ve ark. 2001). Gerçekte, polimerin tipine bağlı olarak voltaj, kritik bir değere sahiptir ve bu kritik değerin ötesinde boncuk veya inci nanofiber oluşumu gözlenir (Haider, 2015).

#### **1.3.2.3.3.2. Çözelti akışının etkisi**

Polimer çözeltinin akış hızı, elektroegirmede önemli bir parametredir. Elektroegirilmiş nanofiberlerin morfolojisi, çözeltinin akışına göre modifikasyonlardan geçebilir. Bu parametre ayrıca kontrol gerektirir çünkü yüksek akış hızlarında Taylor koni düzeyinden

daha büyük damlacıklar oluşabilir ve bu da fiberlerin ortalama çapını ve bilyelerin boyutunu arttırır. Fakat daha düşük akış hızlarında, çözücü buharlaşmaya yetecek kadar zamana sahip olacaktır. Bununla birlikte, daha düşük akış hızlarında, koniden toplayıcıya az miktarda bir çözelti atılır, bu da küçük damlacıkların ve süreksiz fiberlerin oluşmasına neden olur (Zargham vd., 2012). Aslında, akışın kritik bir değeri vardır. Bu kritik değer polimer sistemine göre değişir. Eşik değerden daha yüksek veya daha düşük akış hızlarında düzgün fiberler elde edilemez (Haider, 2015).

#### **1.3.2.3.3.3. İğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafenin etkisi**

Metal iğnenin ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe, fiber morfolojisi üzerindeki etkisinden dolayı kritik bir değerde tutulmalıdır. Bu mesafe aynı zamanda polimer sistemine göre de değişmektedir (Haider, 2015). Bu nedenle, mesafenin değerini optimize etmek gerekir. Ayrıca, çok kısa bir mesafe, kollektöre ulaşmadan önce fiberlerin katılaşmasını önleyebilir ve çok uzun bir mesafe, fiberler üzerinde aynı anda boncuk oluşumuna neden olabilir. Diğer yandan, bir çalışma, iğnenin ucu ile toplama arasındaki mesafenin fiber morfolojisi üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir (Zhang et al., 2005).

#### **1.3.2.3.3.4. Polimer konsantrasyonunun ve çözeltinin viskozitesinin etkileri**

Elektroçirime işlemini etkileyen parametreler üzerine yapılan çalışmalar, polimer çözeltisinin konsantrasyonunun liflerin oluşumundaki rolünü göstermiştir. 2003 yılında Sukigara, çözeltinin düşük viskozitesi ile işaretlenmiş düşük bir konsantrasyonda, incilerin oluştuğunu göstermiştir. Ancak, çözeltinin konsantrasyonunu artırarak, incilerin kaybolduğu ve çapları artan fiberlerle boncuksuz sürekli lifler elde edildiği görülmüştür (Sukigara et al., 2003). Böylece, çözeltinin konsantrasyonu ile fiberin çapı arasında bir ilişki olduğu söylenebilir.

Birçok polimer/çözücü sisteminde, çözeltinin konsantrasyonundaki veya viskozitesindeki bir artış, boncuk kusurlarının sayısındaki bir azalmaya ve elektrospun fiberlerin çapındaki genel bir artışa eşlik eder (Mckee et al. 2004). Aslında, çözeltinin viskozitesi, polimer konsantrasyonundaki değişiklik ile kontrol edilir. Polimer konsantrasyonunun aynı anda arttırılması, çözeltinin viskozitesini arttırır. Solüsyonun viskozitesi, polimer elyafları eğirirken fiber boyutu ve morfolojisinin en önemli belirleyicilerinden biridir. Elde edilen çok düşük viskoziteli liflerin süreksiz hale geldiği

veya bazen liflerin oluşmadığı bulunmuştur. Yüksek viskozitede, polimer jetini iğnenin ucundan çıkarmak zordur (işlemeden önce uçta damlacıkların kuruması nedeniyle). Bununla birlikte, viskozitedeki artış, birkaç boncuk ve kavşak ile tek tip fiberler verir (Golin, 2014).

#### **1.3.2.3.3.5. Nem ve sıcaklığın etkisi**

Sıcaklık fiber çapı ve morfoloji üzerinde dolaylı bir etkiye sahiptir. Sıcaklık, elektroğirme çözeltisinin viskozitesini değiştirir (Golin, 2014). De Vrieze'e göre sıcaklık ve viskozite arasında ters bir ilişki vardır. Polimer çözeltisinin viskozitesi, artan sıcaklıkla azalır. Ek olarak, sıcaklıktaki artış aynı zamanda çözücünün buharlaşma hızını arttırır ve fiber morfolojisini değiştirir (De Vrieze et al., 2009).

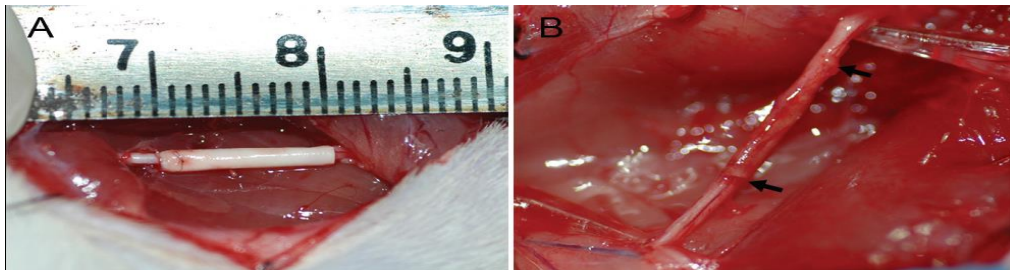
Bağıl nem ayrıca yüklü jelin katılaşma işlemini kontrol ederek nano fiberlerin çapındaki değişikliklere neden olur. Esas olarak bağıl nem, polimerin kimyasal yapısına bağlıdır (Haider, 2015). Elektroğirme ile elde edilen fiberlerin morfolojisi üzerinde bağıl nem oldukça etkilidir (Nezarati, 2014).

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Periferik sinir hasarı, günümüzün en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Bu tip lezyonların tedavisi ile ilişkili komplikasyonlar, özellikle sinir greftinin uyumsuzlukları, diğer daha etkili terapötik metotları gerektirir. Bu nedenle, bilimsel araştırmacılar, yaralı dokuları değiştirmek veya onarmak için malzeme bilimini, tıbbi ve biyolojiyi birleştiren bir alan olan doku mühendisliğini kullanır. Polimer biyomalzemeleri, bu şekilde elektroögirme tekniğinde, proteinler, büyüme faktörleri veya diğerleri gibi moleküller ile emdirilerek nanofiber üretiminde en çok kullanılanlardır. Bu nanofiberlerde ekim yapılan hücreler, emdirilmiş moleküllerin kontrollü salınımına izin verir (Danie Kingsley, J. ve ark., 2013). Hasar görmüş hücrelerin veya dokuların onarılmasına yardımcı olur. Rejeneratif tıpta, özellikle nöral doku mühendisliğinde verimli bir gelişmedir.

Uebersax ve ark.(2007), liyofilizasyonla (20 veya 196 ° C'de dondurma), uygun kalıplarda NGF ve SF'nin sulu çözeltilerinden (% 20, kütle/kütle) hazırlanan NGF yüklü ipek fibroinsinir kanallarını kullanmışlardır. NGF'nin 4 haftalık deneysel bir süre boyunca salınmasının, PC12 hücrelerinin nöritlerin büyümesiyle farklılaşmasına izin verdiğini gözlemişlerdir.

Yu.,W. ve ark. (2011) gibi diğer araştırmacılar, *in vitro* ve *in vivo* olarak sinir modeli olarak kullanılan bir kollajen/poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) fiber iskele yapmışlardır. *In vitro* olarak, bu kolajen/PCL nano lifleri, Schwann hücrelerinin yapışmasını, uzamasını ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür. Ek olarak, *in vivo* test ayrıca tatmin edici sonuçlar vermiştir. Çünkü bu gözenekli sinir kanalları yetişkin sıçanda 8 mm'lik bir siyatik sinirin açılmasıyla sinir rejenerasyonunu başarıyla desteklediğinden sinir nakli ile bu kanalların implantasyonu benzer bir rol oynamıştır (şekil 2.1).



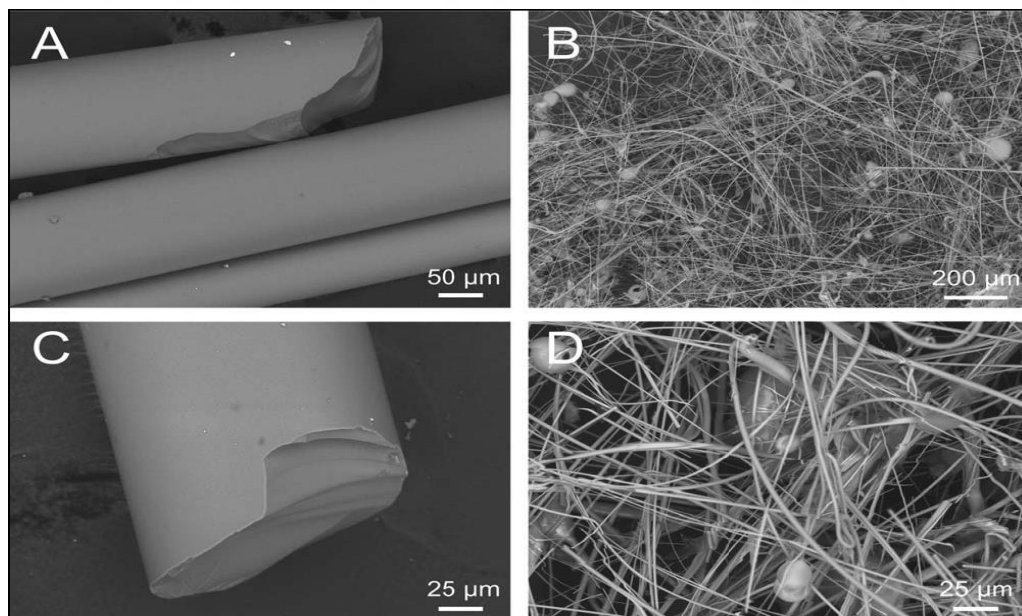
Şekil 2.1. Yu.W ve ark. nın kullandığı deneysel model

Bini ve ark., (2004), 10 mm'lik bir aralıkta siyatik sinir modeli ile polimer bazlı biyobozunur polimerlerin (L-laktid-ko-glikolid) nanofiberleri üzerinde çalışmalar yürütmüşlerdir. Enflamatuvar bir yanıtın olmadığını ve implantasyondan bir ay sonra, on bir rattan beşinin sinir rejenerasyonunda başarılı olduğunu fark etmişlerdir.

Ghasemi-Mobarakeh (2008) tarafından yapılan ve PCL/jelatin biyo-kompozit nanofiberler üzerinde iki farklı 50:50 ve 70:30 oranına sahip bir başka çalışmada PCL/jelatin 70:30 nanofibröz yapı iskelelerinin bu biyo-kompozitin farklılaşma ve çoğalmayı iyileştirdiğini göstermiştir. PCL'nin nano lifli yapı iskelelerine kıyasla sinirler ve nöritlerin büyümesini desteklediğini belirtmiştir.

Diğer araştırmacılar, doku rejenerasyonu için biyoaktif cam iskeleler kullanmışlardır.

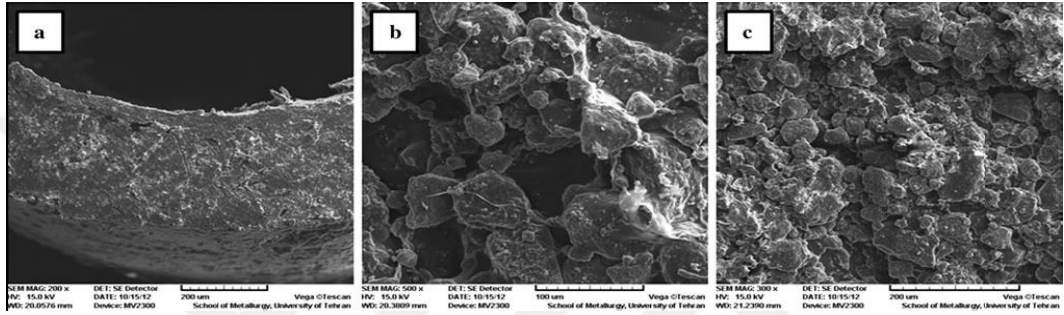
Marquardt ve Fiyatı (2013) biyoaktif borat cam iskelelerini ve fibrin iskelelerini geliştirmişlerdir (şekil 2.2). Daha sonra, bu nanofiberlerdeki karışık nöron kültürleri, gliyal hücreler ve fibroblastlar, periferik sinir lezyonlarının tedavisinde biyoaktif camların oynadığı rolün bilinmesini mümkün kılmıştır. Bu testin ardından, nöronların hücre canlılık oranının, tüm hücre tiplerine kıyasla, kültür protokolünün sonunda, camsız kültüre kıyasla artmış olduğunu bulmuşlardır. Biyoaktif cam yapı iskelelerinin, kontrol fibrin yapı iskelelerinininkine benzer nörit büyümesini arttırdığı görülmüştür.



Şekil 2.2. Marquardt ve Fiyatı'nın geliştirdikleri 13-93 B3 borat biyoaktif camın SEM görüntüleri.

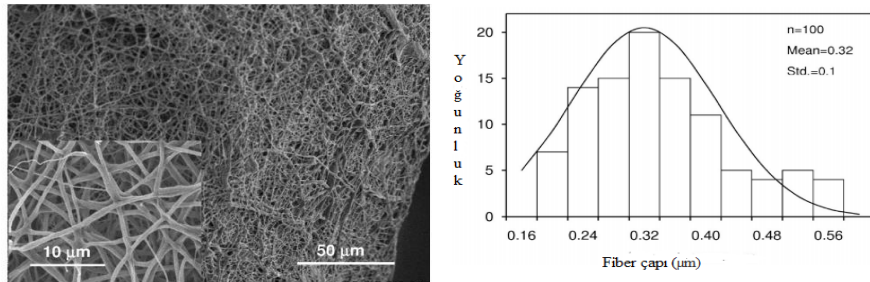
Başka bir çalışmada, Koudehi ve ark. (2013) periferik sinirlerin yenilenmesi için bir nano biyocam/jelatin kanal geliştirmişlerdir (şekil 2.3). 20-50 nm çapında biyoaktif

cam tozu, in-vivo ve in-vitro deneyler için kullanılmıştır. İn vitroda, miapaca-2 hücre hatları üzerinde çalışılan kanalların sitotoksitesinin değerlendirilmesi, nano biyocam/jelatinin toksik olmadığını göstermiştir. İn vivo implant, hayvanlar üzerinde deneyler yapılmıştır. Yetişkin erkek Wistar sıçanları rastgele iki gruba ayrılmış: normal sinir grubu ve nano biyocam/jelatin grubu. Test edilen nano biyocam /jelatin grubunun etkili sonuçlar verdiği görülmüştür. Kanallar, belirgin nöron oluşumu veya ciddi kronik enflamatuar reaksiyonlar veya kılcal damarlarda bol miktarda bulunan ince fibröz bir doku tabakası ile çevrenmemiştir.



Şekil 2.3. Koudehi ve ark'ın elde ettikleri nanokompozit kanalların SEM görüntüleri

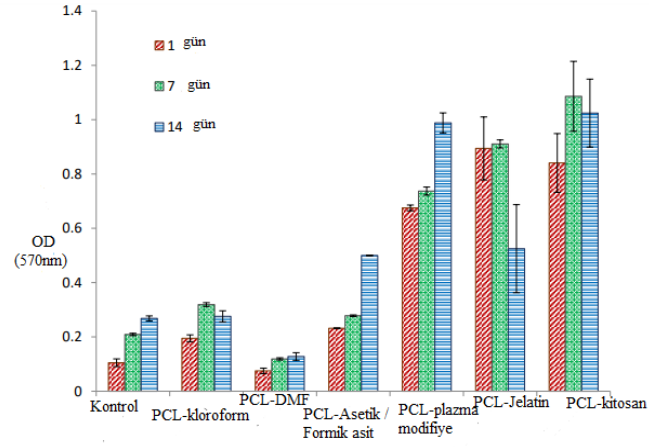
Diğer çalışmada, Allo ve ark. (2010), kemik dokusunun potansiyel rejenerasyonu için biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin (PCL) ve biyoaktif camların (BC) kombinasyonlarına dayanan hibrit malzemeleri (PCL/BC) sol-jel yöntemiyle başarıyla sentezlemişlerdir (Şekil 2.4).Elde edilen fiberlerin kemik rejenerasyonu için iskele olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.



Şekil 2.4. (PCL/BC)H5050 hibrid için elektro-çirilmiş fiberlerin SEM görüntüsü ve fiber çapının dağılımının grafiği (Allo, 2010).

Sadeghi ve ark.,(2018) jelatin ve çitosan ilavesiyle farklı tipte polikaprolakton (PCL) nanofiberler üretmişlerdir. PC12 hücrelerini kullanan in vitro çalışmalar, çitosan

veya jelatin ile karıştırılmış fiberlerin hücre bağlanmasını desteklediğini ve PC12 hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. PCL nanofiberlerde PC12 hücreleri ile hücre canlılığı testinin sonuçları (Sadeghi ve ark., 2018).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan kimyasal Maddeler

Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL, M = 80.000), Tetra etil ortosilikat (TEOS, % 98), trietil fosfat (PET,  $\geq$ % 99,8), Siyanokobalamin (B12), Aseton ve Sinir büyüme faktörü (NGF) ticari olarak (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) alınmıştır.

Tetrahidrofuran (THF) ve Dimetil formamid (DMF) VWR CHEMİKALS'den satın alındı. Magnezyum klorür heksahidrat ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), Hidroklorik asit (HCl), Dimetil sülfoksit (DMSO) ve Etanol Merck'ten satın alındı. İmmüno sorbent tahlili için insan  $\beta$ -NGF kiti (ELISA), Thermo Scientific'ten, Dulbecco'nun modifiye Eagle's Medium'u (DMEM), FBS (Fetal Bovine Serum) ve Penisilin-streptomisin (PS) Gibco'dansatın alındı.

At Serumu (HS) (Biological Industries)'den ve Fosfattanponlusalin (PBS) (Capricorn)'den satın alındı.

#### 3.2. Polimer çözeltilerin hazırlanması

Polikaprolakton bazlı nanofiberler için polimer çözeltileri, iki farklı konsantrasyonda aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Kütlece % 10 PCL çözeltisi: 4 g PCL, 40 mL çözücü karışımında (1:1 oranında Tetrahidrofuran ve N, N Dimetilformamid) çözüldü. Kütlece % 12 PCL çözeltisi: 4,8 g PCL, 40 mL aynı çözücü karışımında çözüldü. Solüsyonlar 3 saat boyunca  $35^\circ C$ 'de manyetik karıştırıcı altında bekletildi. PCL'nin tamamen çözünmesinden sonra, çözeltiler 10 mL'lik cam şırıngalara kondu ve nanofiber eldesi için elektroğirme cihazına yerleştirildi.

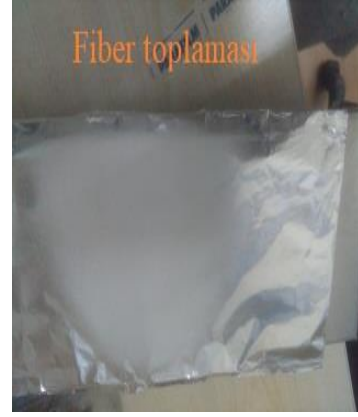
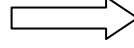
#### 3.3. Elektroğirme işlemi

Elektroğirme tekniği, farklı kategoride nanofiberler sentezine imkân sağlar. Kullandığımız elektroğirme cihazı Ne100 Electrospinning Devices NanoSpinner marka idi. Aşağıdaki elektroğirme tertibatı bir aspiratör, yüksek voltajlı doğru akım beslemesi, yüksek hızlı bir şırınga pompası ve bir plaka toplayıcıdan (alüminyum kaplı) oluşmaktadır. Fiber üretimi için 21G düz uçlu bir iğne kullanılmıştır. İşlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen PCL çözeltisi 10 mL lik enjeksiyona yerleştirilerek optimizasyon işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. Elektroğirme cihazı  
(Ne 100 Electrospinning Devices NanoSpinner)



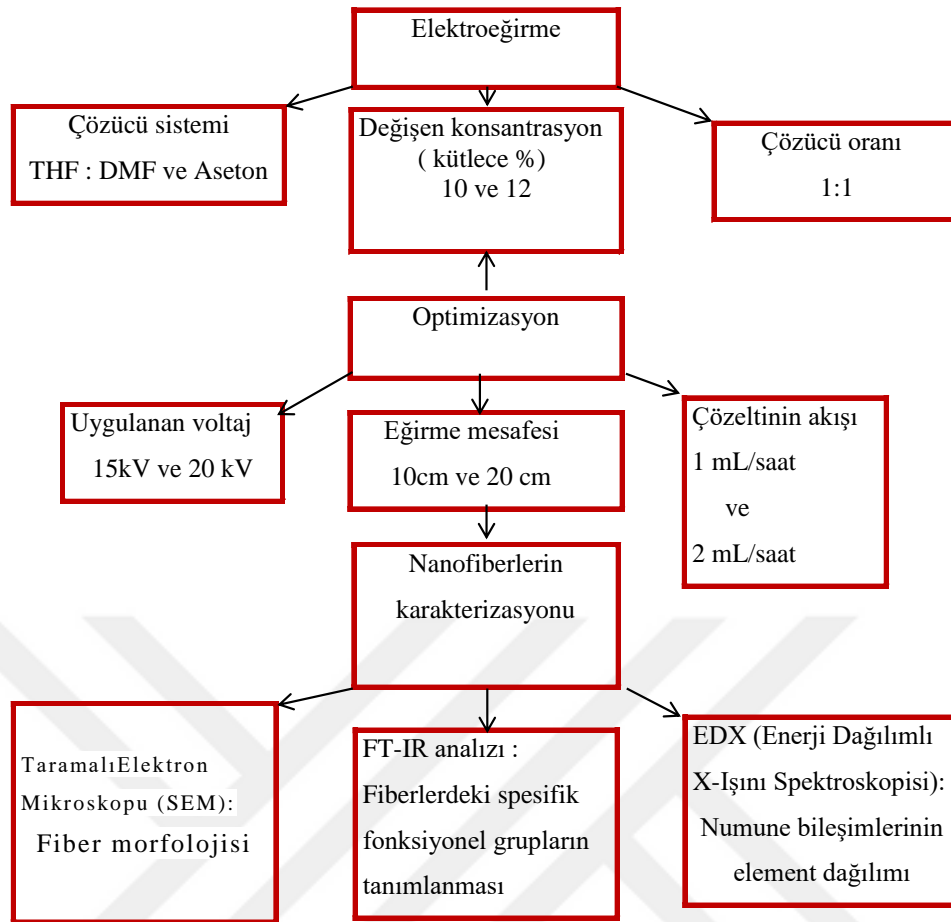
Şekil 3.2. Plaka kolektörünü kaplayan alüminyum folyo üzerine fiber toplama

### 3.4. Polikaprolakton nanofiberlerine elektroğirme parametresinin optimizasyonu

Nano fiberler için en iyi elektroğirme koşullarını bulmak için ilk önce parametrik optimizasyon testleri yapıldı ve tablo 3.1 de verildi.

Tablo 3.1. Optimizasyon testleri sırasında çeşitli nano fiberler üretmek için elektroğirme parametreleri

İşlem parametreleri	Değişkenler
PCL konsantrasyonu (kütlece %)	10
	12
Uygulanan voltaj	15 kV
	20 kV
Eğirme mesafesi	10 cm
	20 cm
Çözeltinin akışı	1 mL/saat
	2 mL/saat



Şekil 3.3.Elektroegirme ve nanofiberlerin karakterizasyon şeması.

### 3.5. Hibrit biyoaktif camların sentezi (PCL/BC)

Sol-jel yöntemi, hibrid (PCL/BC) kompozit çözeltisinden fiberlerin sentezlenmesi için kullanılmıştır.Sentezlenen biyoaktif cam, kütlece % 70 PCL ve kütlece % 30 BC (biyoaktif cam) içeren /PCL / BC) hibrid kompozittir (H7030).

Polimer çözeltisi, aseton içinde bir miktar PCL (kütlece % 5), 35°C'de 24 saat manyetik karıştırma altında çözülerek hazırlandı. PCL tamamen çözüldükten sonra, katalizör olarak, birkaç damlader. HCl ve ardından TEOS (2.96 mL) ilave edildi. Karışım asit hidrolizinin tamamlanması için 30 dakika magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra TEP (0.23 mL) ilave edildi ve karışımın hidrolizi 45 dakika sürdü. Daha sonra 0,22 g, 2,5 mL etanolde çözülerek hazırlanan MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O eklendi. Solüsyon, hidroliz reaksiyonunun tamamlanması için 1 saat 30 dakika boyunca 35°C'de manyetik karıştırıcıda bırakılırdı. Hidrolizden sonra elde edilen homojen çözelti, daha sonra 10 mL'lik bir cam

şırıngaya aktarılır ve 1 saat boyunca nanofiberlerin sentezi için elektroğirme cihazında elektroğirme işlemi uygulanır.

B12 vitamini içeren hibrit kompozit (PCL/BC)-B12 (% 70 PCL, %30 BC içeren) için, Polikaprolakton/bioaktif cam solüsyonunun karışımı homojen hale getirildikten sonra, 30 mg B12 vitamini (Cyanocobalamin) etanolde çözülür ve sonra çözeltiliye eklenir. Karışım daha sonra oda sıcaklığında, çözelti yarı-viskoz hale gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karışım, 10 mL'lik bir cam şırıngaya aktarılır ve elektroğirme metodu ile nanofiberler elde edilir.

### 3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Nanofiber Analizi

Elde edilen fiberin morfolojisi taramalı elektron mikroskobunda (SEM, Hitachi - SU 1510) 15 kV'lık voltaj altında gözlemlendi. Görüntüleme öncesi, numuneler bir kesici kullanılarak 3 mm x 5 mm'lik bir boyuta kesildi. Daha sonra kurutuldu ve bir püskürtme cihazı (DENTOM VACUUM DESK V) kullanılarak 20 dakika boyunca 52 mA'de altınla kaplandı. 100X ve 200X mesh numunelerindeki görüntüler, temsili morfolojileri belirlemek için analiz edildi. Fiber çapı ölçümleri, Image J ölçüm aracı (NIH'den temin edilebilen açık kaynaklı yazılım) kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

### 3.7. EDX spektroskopisi ile (Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi) fiber analizi

İki örneğin, (PCL/BC) ve (PCL/BC)-B12, dağılımı ve kimyasal bileşimi SEM'e bağlı bir EDX dedektörü kullanarak (Hitachi - SU 1510) analiz edildi. Elektroegirme ile elde edilen fiberlerden alınan numuneler, DENTOM VACUUM DESK V ile püskürtülerek altınla kaplandı.

### 3.8. Sentezlenmiş biyomalzemelerin FT-IR analizi

Sentezlenen nanofiberlerde bulunan spesifik fonksiyonel gruplar  $\text{cm}^{-1}$  çözünürlüğe sahip bir analizör (FT-IR) Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi FT-IR (Nicolet iS5 Thermo Scientific) kullanılarak tanımlandı.

### 3.9. İn vitro çalışmalar

#### 3.9.1. PC12 hücre kültürü

PC12 hücreleri (ATCC CRL-1721), % 10 at serumu (HS), % 5 FBS (fetal bovine serumu) ve % 1 antibiyotik çözeltisi (10 U/mL penisilin ve 10  $\mu\text{g}$  / mL streptomisin) içeren Dulbecco's Modifiye Eagle's Medium'da (DMEM)%5  $\text{CO}_2$  ve 37°C'de kültüre edildi. Besiyeri iki günde bir kez değiştirildi. Hücreler, deneyler için gerekli yoğunluğa ulaşana kadar kültürasyon işlemi devam etti ve hücre kaybını önlemek için gerekli yoğunluğa ulaşana kadar kültürasyon işlemi devam etti ve hücre kaybını önlemek için gerekli yoğunluğa ulaşana kadar kültürasyon işlemi devam etti ve hücre kaybını önlemek için gerekli yoğunluğa ulaşana kadar kültürasyon işlemi devam etti. Hücreler Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve üç farklı tipte nano fiber üzerine ekildi. PC12 hücrelerinin hücre farklılaşması deneyi için 96 kuyucuklu bir plaka içerisinde  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi.

#### 3.9.2. Kültür kabı yüzeyinin Matrijel ile kaplanması

25  $\text{cm}^2$ 'lik hücre kültürü (T25-flask) kabına, 43  $\mu\text{L}$  Matrijel, 4 mL DMEM (1X) ile karıştırıldı ve 37°C'de ve % 5  $\text{CO}_2$ 'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra PC12 hücreleri, matrigeli içeren kültür kabına aktarıldı. Hücre kümelerini ayırmak için hücre süspansiyonu 22 G iğneli 10 mL'lik bir enjektör kullanılarak 4 veya 5 kez pipetajlama işlemi gerçekleştirildi.

### 3.9.3. Nanofiberlerin L929 hücreler üzerindeki hücre canlılığı testi

Sentezlenen fiberlerin fibroblastik hücreler (L929) üzerindeki hücre canlılığı testi, MTT (tiazolil mavi tetrazolium bromür) ile değerlendirildi. İlk olarak, fiberlerin normal insan fibroblast hücreleri (L929) üzerindeki etkisi değerlendirildi. Bu amaçla, L929 fibroblast hücreleri, %10 FBS içeren dulbecco's modifiye eagle's medium (DMEM) besiyerinde (Gibco) 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (ESCO) kültüre edildi. Hücrelerin 24 kuyucuklu kültür kabına tutunmaması için tabanları parafilm ile kaplandı. Fiberler parafilm üzerinde kalacak şekilde yerleştirildi ve daha sonra 30 dakika boyunca UV ışığı ile sterilize edildi. Parafilm-bağlı fiberler üzerine  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde L929 hücreleri ekildi ve 72 saat boyunca kültüre edildi. Daha sonra, hücre kültür ortamına 50 µL MTT çözeltisi ilave edildi ve 3 saat süreyle inkübe edildi. Reaksiyonda oluşan koyu mavi formazan kristalleri 500 µL DMSO içinde çözüldü. Deney 3 gün boyunca tekrar edildi. Her gün, çözeltinin optik yoğunluğu (OD), her numunenin hücre canlılığını değerlendirmek için bir absorbans plaka okuyucusu (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılarak 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

### 3.9.4. Nanofiberlerin PC12 hücreler üzerindeki hücre canlılığı testi

Sentezlenen fiberlerin PC12 hücreleri üzerinde canlılık ve proliferasyon etkilerini belirlemek için MTT (tiazolil mavi tetrazolium bromür) deneyi gerçekleştirildi. PC12 hücreleri, % 10 FBS ve % 1 antibiyotik çözeltisi ile (10 U/mL penisilin ve 10 µg/L streptomisin) içeren Dulbecco's Modifiye Eagle's Medium'da (DMEM) 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında kültüre edildi. Tüm nanofiber numuneleri ultraviyole ile sterilize edildi ve 96 kuyucuklu kültür kaplarına yerleştirildi. Daha sonra, fiberler matrijel ile kaplandı. Üzerine  $2 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde PC12 hücreleri ekildi ve 72 saat boyunca kültüre edildi. Süre sonunda MTT ajanı kullanılarak canlılık oranları belirlendi.

### 3.9.5. PC12 hücre farklılaşması çalışması

PC12 hücreleri, NGF salımının biyoaktivitesini üç farklı nanofiberle (PCL nanofiber ve B12 vitamin içeren ve içermeyen hibrit nanofiberler) değerlendirmek için kullanılmıştır. Hücre farklılaşmasının gözlemlenmesi için, fiber ve PC12 hücreleri,

aşağıdaki şekilde oluşturulan bir NGF (+) farklılaşma ortamında kültüre edildi: DMEM, % 1 HS, % 1 antibiyotik çözeltisi (10 U/mL penisilin ve 10µg/mL streptomisin). Üç farklı konsantrasyonda NGF kullanılmıştır: 25 ng/mL, 50 ng/mL ve 100 ng/mL. Kontrol olarak, PC12 hücreleri fiber içermeyen ortamda kültüre alındı. Ayrıca farklılaşma açısından kontrol olarak, PC12 hücreleri ve fiberler NGF içermeyen ortamda büyütüldü. PC12 hücreleri ( $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk) bir hafta boyunca 96 kuyucuklu kültür kabı içerisinde inkübe edildi. Farklılaşma besiyeri iki günde bir değiştirildi.

### 3.9.6. Sinir büyüme faktörünün biyoaktivitesinin in vitro değerlendirilmesi

Salınan NGF'nin biyolojik aktivitesi, salınan NGF'yi içeren bir ortamda kültüre edilen PC12 hücrelerinin nöral farklılaşması ve nörit uzantısı kapasiteleri değerlendirildi. Hücre farklılaştırma çalışması için PC12 hücreleri üzerinde NGF-ELISA testi yapıldı. Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ng / mL) NGF ile muamele edilen PC12 hücreleri beşinci günde farklılaşmıştır. NGF'nin hücre farklılaşması üzerindeki etkisini doğrulamak için, PC12 hücrelerinin kondisyonal ortamları kullanılarak NGF seviyeleri, insan beta-NGF ELISA kiti (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) kullanılarak belirlendi. ELISA deneyinde, reaktifler ve standartlar kittede verilen talimatlara göre hazırlandı. Kuyucuğa 100 µL standart ve numune konuldu ve plaka, oda sıcaklığında 2,5 saat süreyle inkübe edildi. Kuyucuklar daha sonra dört kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µL biyotin etiketli bir antikor ilave edildi ve plaka, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi. Plaka daha sonra dört kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µL Streptavidin HRP (yaban turpu peroksidaz) reaktifi ilave edildi. Plaka oda sıcaklığında 45 dakika daha inkübe edildi ve daha sonra dört kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µL TMB substrat (3.3', 5.5'-tetrametilbenzidin) eklendi. Daha sonra plaka 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. Son olarak her bir kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi ilave edildi. Her bir kuyucuğun 450 nm'sindeki optik yoğunluk, bir mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılarak ölçüldü. NGF miktarı standart eğriden yararlanılarak hesaplandı.

### 3.9.7. NGF'nin in vitro salınımı çalışması

Sentezlenen üç tip nanofiber için NGF salınımı, 3 günlük bir süre zarfında in vitro olarak belirlenmiştir. Fiberler ilk olarak UV altındasterilize edildi ve her fiber, 96

kuyucuklu bir plakada dört oyuğa konuldu. Bu fiberlere 1 ng NGF çözeltisi eklendi ve gece boyunca kurumaya bırakıldı. Tam kuruduktan sonra, fiberlere 200 µL PBS ilave edildi ve 37°C ve % 5 CO<sub>2</sub>'de 10 dakika, 1 saat, 1 gün ve 3 gün süreyle inkübe edildi. Bu zaman aralıkları boyunca oyuklardaki çözelti tamamen toplandı. Toplanan her çözelti -20°C'de saklandı. Toplanan örneklerdeki NGF seviyeleri insan beta-NGF ELISA kiti (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) ile belirlendi.



## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

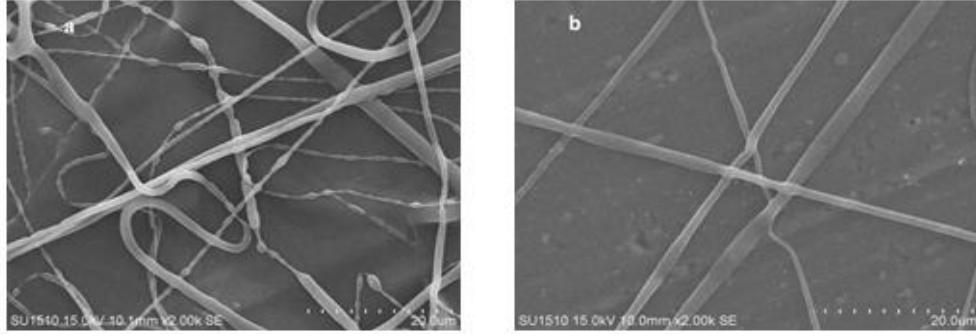
### 4.1. Fiber morfolojisinin optimizasyon parametreleri üzerine etkisi

Solüsyonun konsantrasyonu, voltaj, akış hızı ve mesafe (iğnenin noktası ile toplama plakası arasındaki mesafe) gibi dört parametre optimize edilmiştir (Tablo 4.1).

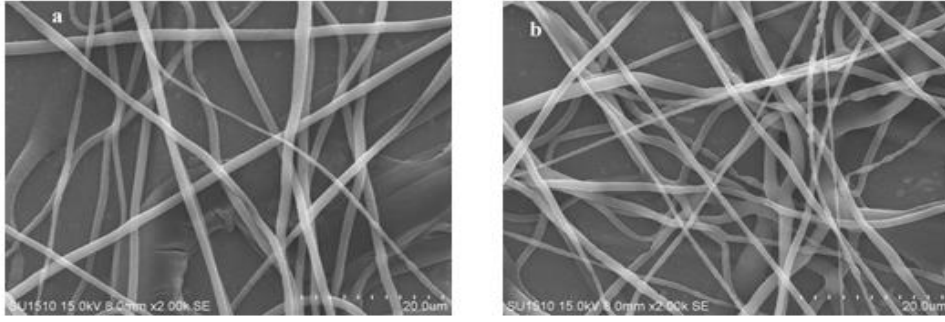
**Tablo 4.1.** Fiber morfolojisinin farklı parametrelere bağlılığı

Parametreler	Fiber morfolojisi
Konsantrasyon (kütlece %) 10 12	Düzgün olan fiberler Düzgün olmayan fiberler
Uygulama voltajı 15 kV 20 kV	Tek tip olan, düzgün fiberler Düzgün olmayan fiberler
Mesafe 10 cm 20 cm	Düzgün olmayan fiberler Düzgün olan fiberler
Çözelti akışı 1 mL/saat 2 mL/saat	İnci oluşumlu fiberler İnci oluşumu olmayan fiberler

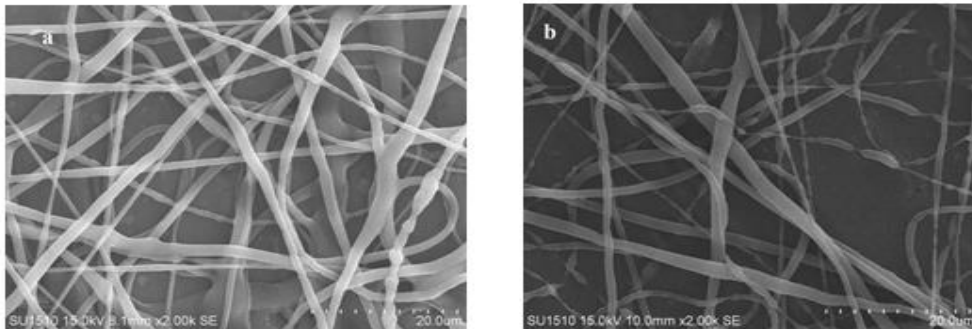
Optimize edilmiş polikaprolakton nanofiber morfolojilerinin 200X SEM görüntüleri Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4 de verilmektedir.



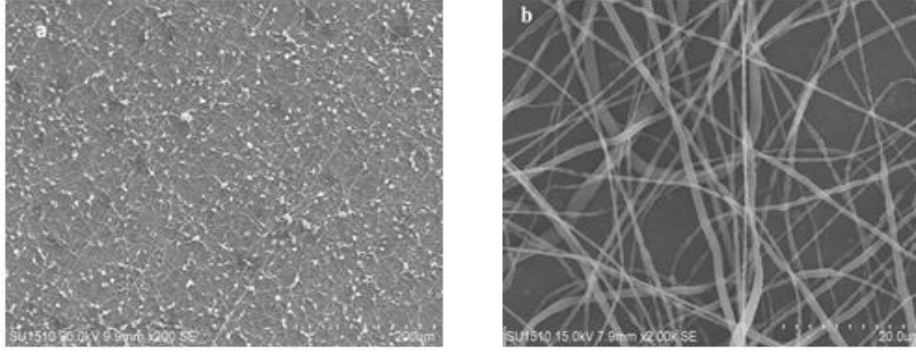
**Şekil 4.1.** Polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine mesafenin etkisi  
**a)**10 cm (düzgün olmayan fiberler); **b)** 20 cm (düzgün olan fiberler)



**Şekil 4.2.**Uygulanan voltajın polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine etkisi  
**a)**15 kV (Tek tip olan, düzgün fiberler); **b)**20 kV (düzgün olmayan fiberler)



**Şekil 4.3.** Konsantrasyonun polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine etkisi  
**a)** kütlece % 10 PCL (Düzgün olan fiberler); **b)** kütlece % 12 PCL (Düzgün olmayan fiberler).



**Şekil 4.4.** Çözeltinin akışının polikaprolakton fiberlerinin morfolojisi üzerine etkisi  
**a)** 1 mL/saat (İnci oluşumlu fiberler); **b)** 2 mL/saat (inci oluşumu olmayan fiberler)

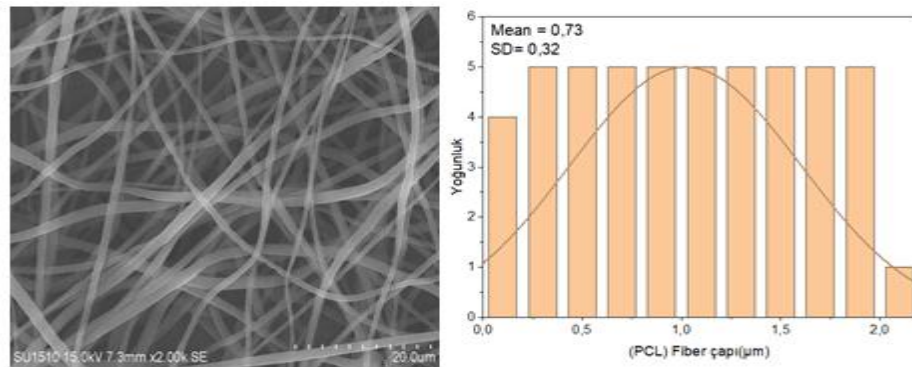
Fiberlerin optimizasyonu, tetrahidrofurandimetilformamid (1:1) çözücü karışımında polikaprolakton nano liflerin başarılı bir şekilde sentezi için uygun parametrelerin seçilmesini mümkün kılmıştır.

Böylece, 15 kV'luk bir voltaj, 20 cm'lik bir mesafe ve 2 mL/saat'lik bir akış hızı ile en iyi polikaprolakton fiberleri elde etmek mümkün olmuştur. Bu koşullar, B12 vitamini ve B12 vitamini içermeyen hibrit biyoaktif cam fiberlerinin sentezi için de uygun olduğu için kullanılmıştır.

## 4.2. Nanofiberlerin SEM ve EDX ile karakterizasyonu

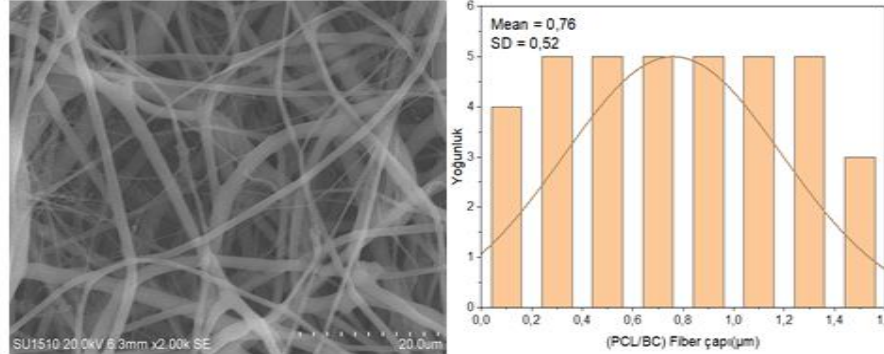
### 4.2.1. Nanofiberlerin SEM ile karakterizasyonu

PCL Nanofiberlerin SEM görüntüsü ve nanofiberlerin çaplarının dağılım grafiği Şekil 4.5. de verilmektedir. Grafikten görüldüğü gibi ortalama fiber çapı  $0,73 \pm 0,32$   $\mu\text{m}$ 'dir.



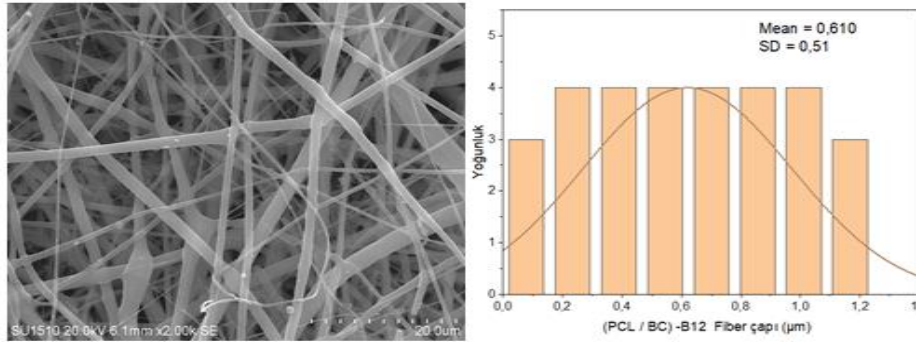
**Şekil 4.5.** PCL nanofiberlerin 200X SEM görüntüsü ve nanofiberlerin çap dağılım diyagramı

PCL/BC nanaofiberlerin SEM görüntüsü ve nanofiberlerin çaplarının dağılım grafiği Şekil 4.6. da verilmektedir. Grafikten görüldüğü gibi ortalama fiber çapı  $0,76 \pm 0,52$   $\mu\text{m}$ 'dir.



Şekil.4.6. (PCL/BC) nanofiberlerin 200X SEM görüntüsü ve fiber çap dağılım diyagramı

(PCL/BC)-B12 nanaofiberlerin SEM görüntüsü ve nanofiberlerin çaplarının dağılım grafiği Şekil 4.7. de verilmektedir. Grafikten görüldüğü gibi ortalama fiber çapı  $0,61 \pm 0,51$   $\mu\text{m}$ 'dir. Görüldüğü gibi sentezlenen nanofiberlerin ortalama çapları birbirine yakındır ve nano boyuttadır.

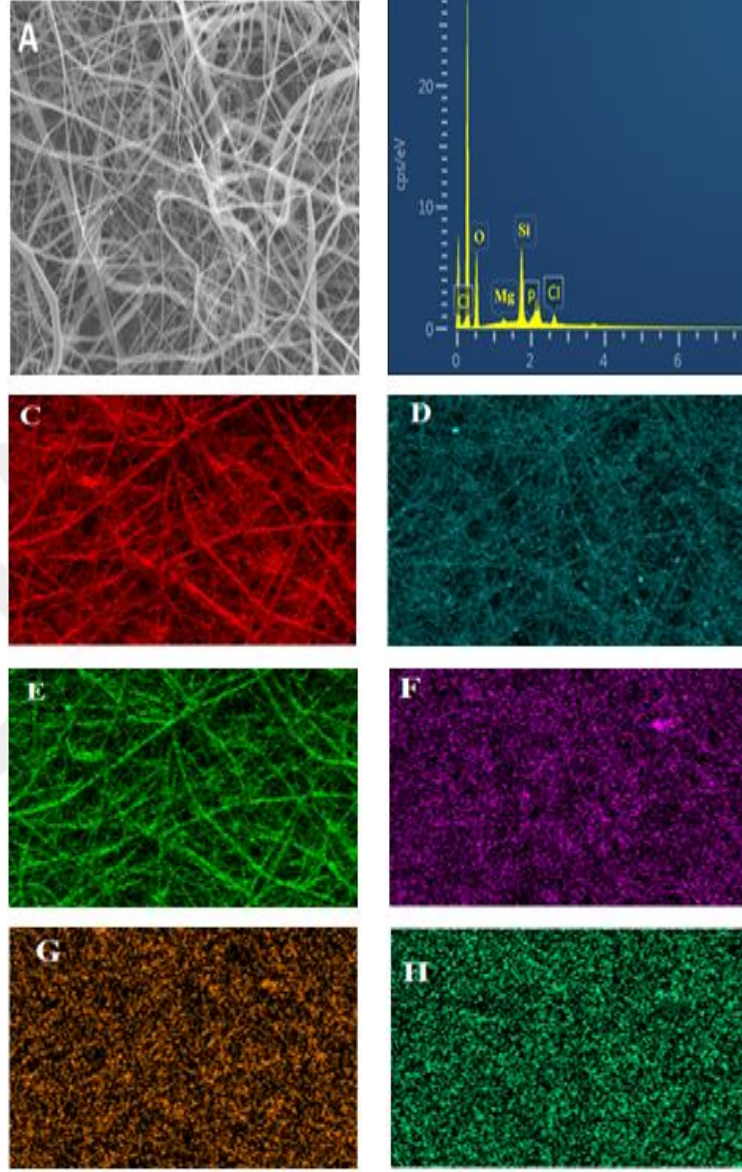


Şekil. 4. 7. (PCL/BC)-B12 nanofiberlerin 200X SEM görüntüsü ve fiber çap dağılım diyagramı

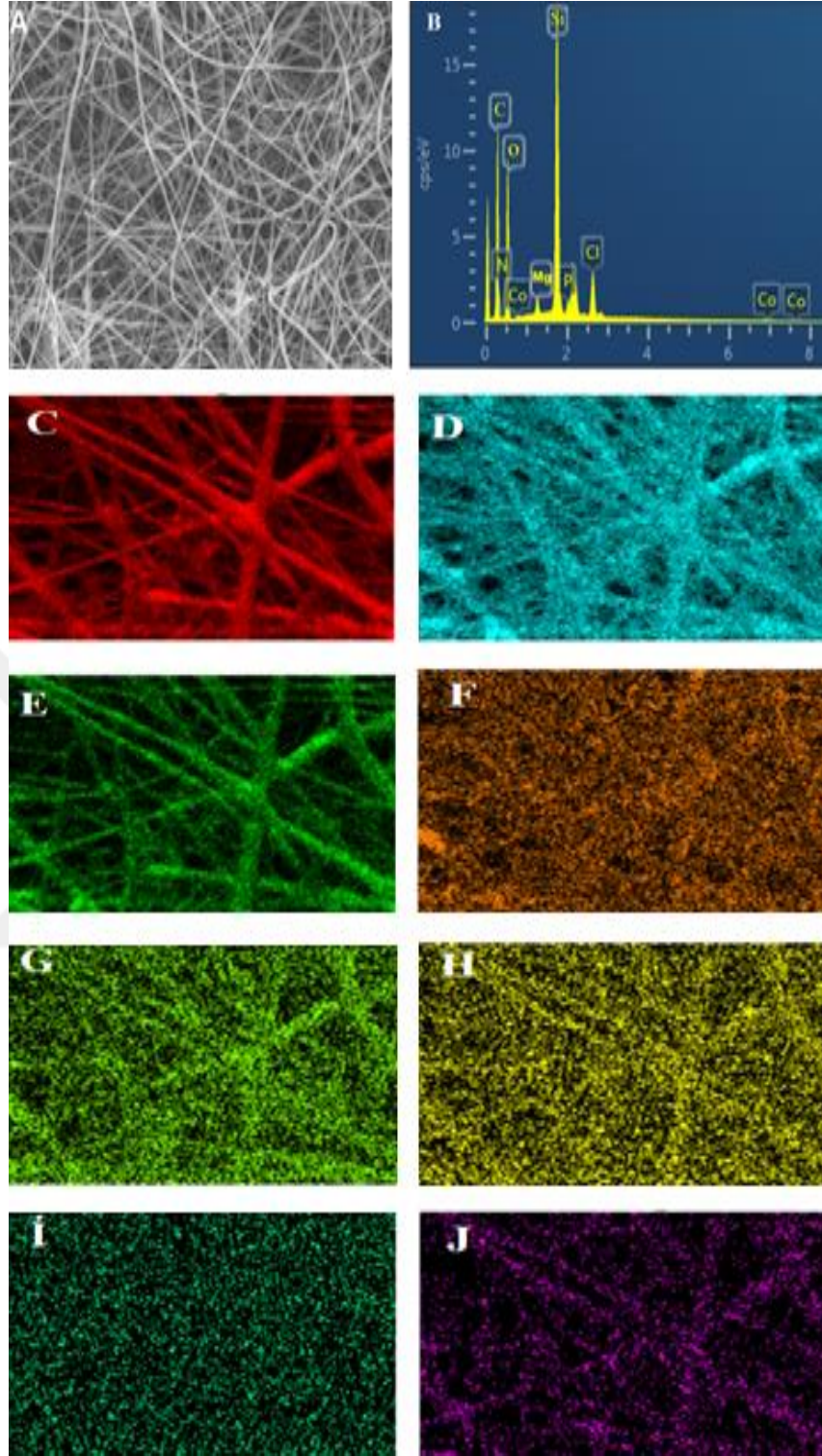
#### 4.2.2. Sentezlenen nanofiberlerin EDX ile karakterizasyonu

PCL nanofiberler sadece C ve O atomları içerdiğinden EDX ölçümlerine gerek görülmedi. PCL/BC hibrid biyoaktif cam nanofiberler için tüm bileşimlerinin elementel dağılımını EDX kullanılarak incelenmiştir. Bu hibrit biyoaktif cam nanofiberlerin örnekleri için EDX analizinin sonuçları Şekil 4.8'de verilmiştir. Biyoaktif camdan dolayı eklenen Si, P, Mg, Cl elementleri EDX spektrumunda görülmektedir. Şekil 4.9 da ise (PCL/BC)-

B12 nanofiberler için EDX sonuçları verilmektedir. Hibrit nanofibere eklenen B12 vitamininden kaynaklanan Co ve N elementleri de bu nanofiberde görülmektedir.



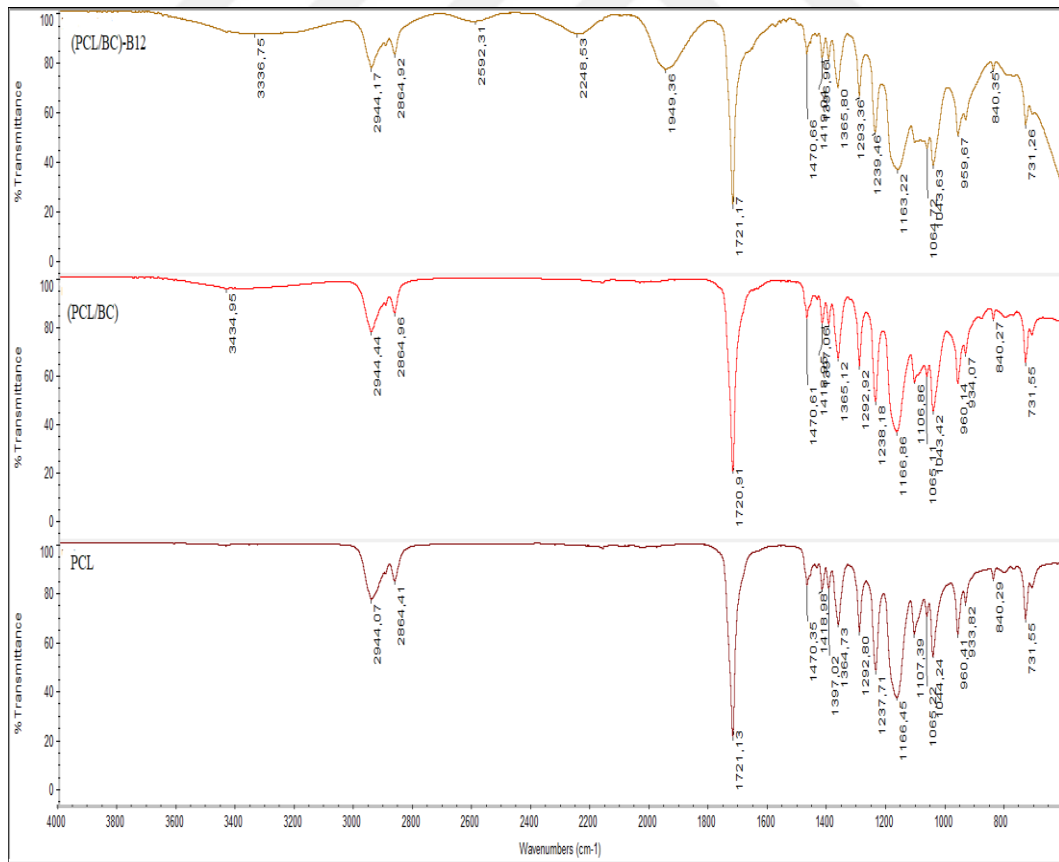
**Şekil. 4.8.** Hibrit (PCL/BC) nanofiberlerin (A) SEM görüntüsü, (B) EDX spektrumu ve Karbon (C), Silisyum (D), Oksijen (E), Fosfor (F), Magnezyum (G) ve Klor (H) atomları için elementel haritalanması



**Şekil. 4.9.** Hibrit (PCL/BC)-B12 nanofiberlerin (A) SEM görüntüsü, (B) EDX spektrumu ve nanofiberlerdeki Karbon (C), Silisyum (D), Oksijen (E), Klor (F), Magnezyum (G), Fosfor (H), Kobalt (I) ve Azot (J) atomlarının elementel haritalanması

### 4.3. FT-IR analizi ile biyomalzemelerin karakterizasyonu

Sentezlenen nanofiberlerin IR spektrumları Şekil 4.10 da verilmektedir. PCL nanofiberler için  $2944\text{ cm}^{-1}$  de görülen pik asimetric  $\text{CH}_2$  gerilmesine,  $2864\text{ cm}^{-1}$  deki pik simetric  $\text{CH}_2$  gerilmesine,  $1721\text{ cm}^{-1}$  deki pik  $\text{C}=\text{O}$  gerilmesine,  $1292\text{ cm}^{-1}$  deki pik  $\text{C}-\text{O}$  ve  $\text{C}-\text{C}$  gerilmesine,  $1237\text{ cm}^{-1}$  deki pik  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  düzlem içi asimetric eğilmesine ve  $1166\text{ cm}^{-1}$  deki pik düzlem içi simetric  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  eğilmesine karşılıktır (Özsağıröglü, 2011).  $\text{C}=\text{O}$  pikleri ve simetric ve asimetric  $\text{CH}_2$  gerilmesi her üç nanofiberde de görülmektedir. PCL/BC nanofiberlerde biyoaktif camda bulunan silanol gruplarıyla ilgili hidrojen bağı O-H titreşimleri  $3434\text{ cm}^{-1}$  de görülmektedir. Silanol grupları, TEOS'un tamamlanmamış polikondansasyonundan kaynaklanır (Allo ve ark., 2010). B12 vitaminli nanofiberin FTIR spektrumunda  $2248\text{ cm}^{-1}$  de görülen pik CN gerilmesine,  $1949\text{ cm}^{-1}$  de görülen pik asimetric  $\text{N}=\text{C}$  gerilmesine (Jones ve ark., 2012) karşılıktır.



Şekil 4.10. Sentezlenen nanofiberlerin FT-IR spektrumları.

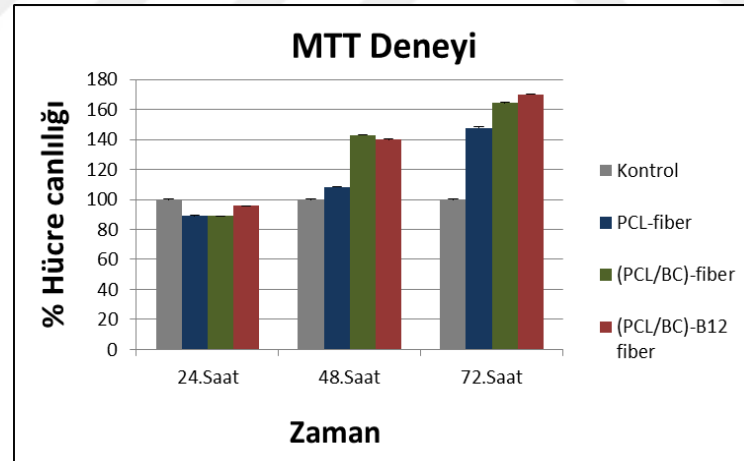
#### 4.4. Üretilen nanofiberlerde L929 hücrelerinin hücre canlılığı testinin sonucu

Deney sonuçlarına göre, polikaprolakton fiberler (PCL-fiber) üzerinde büyütülen hücrelerde, kontrolle karşılaştırıldığında 48 saatte % 8,3 ve 72 saatte % 47,8 oranında bir artış tespit edildi.

Polikaprolakton biyoaktif cam hibrid kompozisyonunun (PCL/BC) nanofiberleri için hücre canlılığı sonuçları, kontrole kıyasla 48 saatte % 42,8, 72 saatte % 64,3 artış gösterdi.

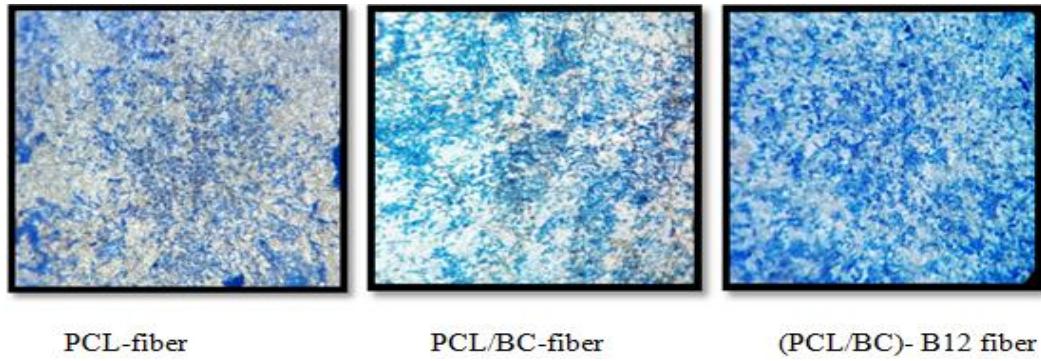
Ek olarak, B12 vitamini eklenmiş polikaprolakton biyoaktif camının (PCL/BC)-B12 hibrit bileşiminin nanofiberleri, L929 fibroblast hücrelerinin hücre çoğalmasını, kontrole kıyasla 48 saatte % 40 ve 72 saatte % 70 arttırdı. Dolayısıyla ürettiğimiz nanofiber iskeleleri biyo-uyumludur, L929 fibroblast hücrelerinin çoğalmasını teşvik eder.

L929 fibroblast hücreleri üzerindeki hücre canlılık testi (MTT) üretilen nanofiberlerin biyoyumlu ve toksik olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, bu fiberler doku mühendisliğinde terapötik amaçlar için kullanılabilir.



Şekil 4.11.Nanofiberlerde L929 hücre ekiminden sonra MTT testi

Kültürlenmiş L929 hücreleri metilen mavisi ile boyandı ve inverted mikroskop altında 10X gözlemlendi ( Şekil 4.12).

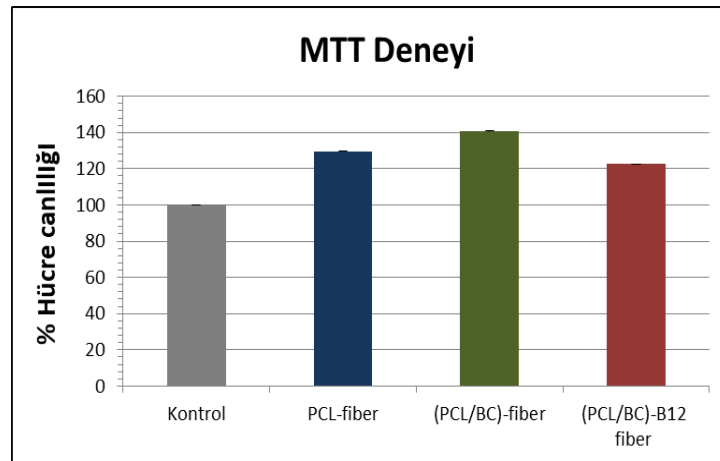


Şekil 4.12. Nanofiberlerde kültüre edilen L929 hücrelerinin metilen mavisi ile boyandıktan sonra inverted mikroskoptaki görüntüleri.

#### 4.5. Üretilen nanofiberlerde PC12 hücrelerinin hücre canlılığı testinin sonuçları

Üretilen üç nanofiberler için, PC12 hücreleri üzerindeki hücre canlılık testi (MTT), biyoyumlu olduklarını ve toksik olmadıklarını göstermiştir.

Bu nedenle, bu fiberler doku mühendisliğinde terapötik amaçlar için kullanılabilir niteliktedir. Nanofiberlerde PC12 hücre hattı ekiminden 3 gün sonraki MTT testi sonuçlarına göre; PCL-nanofiber için hücre canlılığı % 30 artmış, PCL/BC nanofiber için PC12 hücre canlılığı testi, kontrole kıyasla % 40,1 oranında artmıştır ve B12 vitaminli biyoaktif cam fiber (PCL/BC)-B12 için kontrol grubuna göre % 22,6 artmıştır.



Şekil 4.13. Nanofiberlerde PC12 hücre ekiminden sonra MTT testi

PCL nanofiberlerde hücre canlılık testi sonuçları, hücre canlılığının sadece fiberlerin sentezi sırasında kullanılan çözücüye veya PCL'ye ilave edilen maddelere

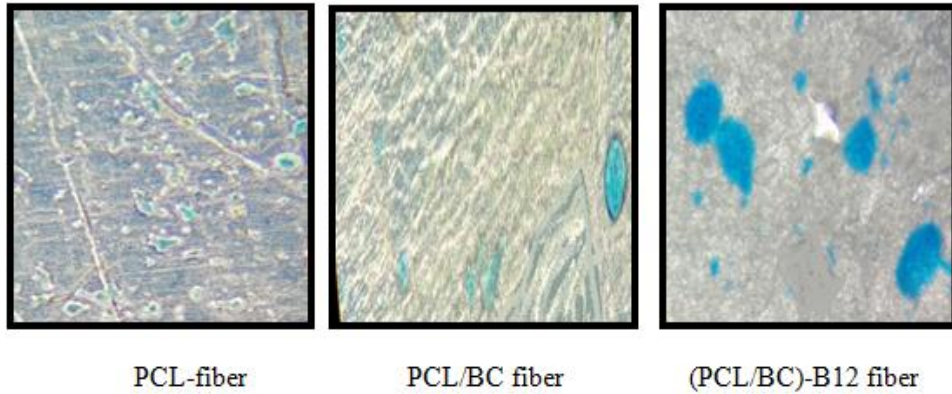
(biyoaktif cam ya da B12 vitamini) değil, aynı zamanda hücre tipine de bağlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda saf PCL nanofiberler için, L929 hücrelerinde PC12 hücrelerinden daha yüksek proliferasyon gözlemlendi. Ancak PCL/BC nanofiberler, PC12 hücrelerinde L929 hücrelere göre daha yüksek proliferasyona neden oldu. (PCL/BC)-B12 nanofiberlerde ise L929 hücrelerinde PC12 hücrelerine göre yüksek proliferasyona neden olduğu gözlenmiştir..

Sadeghi ve ark. (2018), PCL nanofiberler sentezlemek için farklı çözücüler kullanarak ve PCL'ye doğal ürünler ekleyerek yaptıkları çalışmada, iki hücre hattı (L929 ve PC12 hücreleri) üzerinde hücre canlılık testi yapmışlardır. Sentezledikleri saf PCL (çözücü olarak dimetil formamid) fiberlerin L929 hücrelerinin PC12 hücrelerine kıyasla yüksek proliferasyona yol açtığını göstererek bizim sonuçlarımıza benzer bir sonuç bulmuşlardır.

Her durumda, saf PCL nanofiberler veya doğal ya da sentetik elementlere eklenen PCL nanofiberler, bu iki hücre tipinin (L929 ve PC12 hücreleri) çoğalması için uygundur.

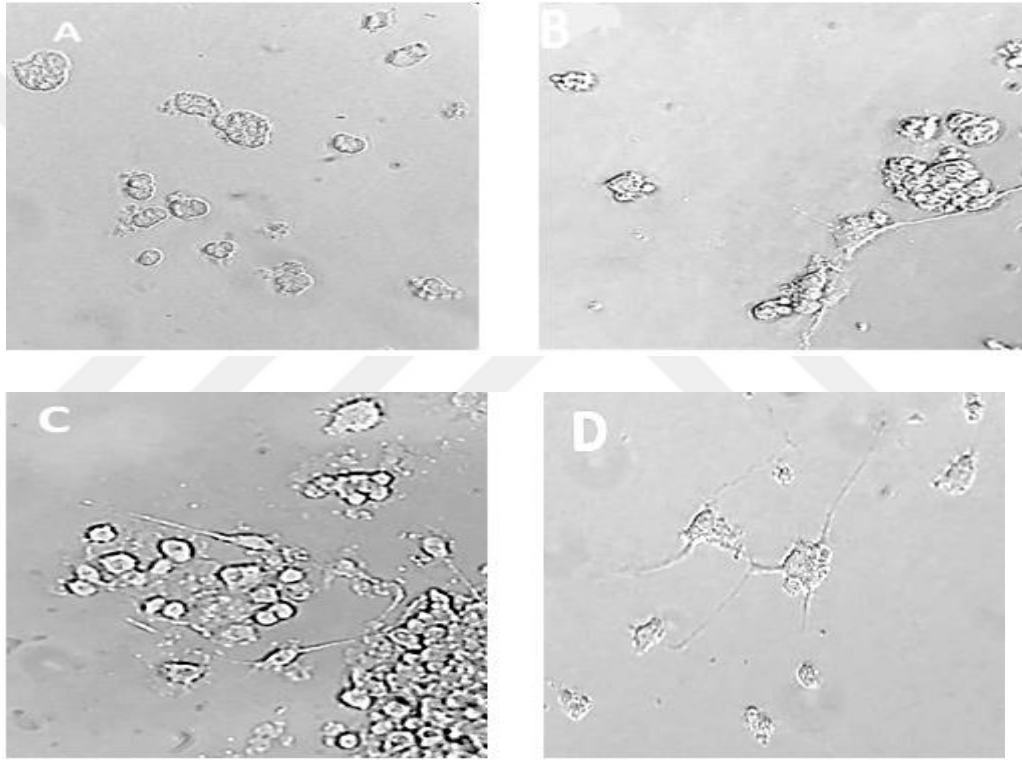
Kültüre edilen PC12 hücrelerinin kital viyole ile boyandı ve inverted mikroskop altında 10X gözlemlendi (Şekil 4.14).



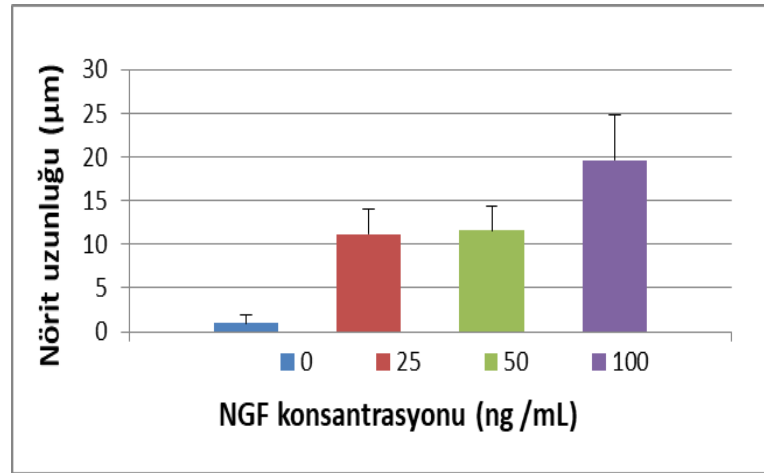
**Şekil 4.14.** Nanofiberlerde kültürlenmiş PC12 hücrelerinin kital viyole ile boyandıktan sonra inverted mikroskopta elde edilen görüntüler.

#### 4.6. Hücre farklılaşması sonuçları

Hücre kültürüne (25, 50, 100 ng/mL) farklı NGF konsantrasyonları ilave edildikten sonra PC12 hücreleri, nörit oluşturan nöral hücelere farklılaşmıştır. (0, 25, 50 ve 100 ng/mL) NGF'nin PC12 hücrelerinin morfolojisi üzerindeki etkileri beşinci günde gözlemlendi (Şekil 4.15). Görüntüler analiz edildi ve nöritlerin uzunluğu imageJ yazılımı ile ölçüldü. Nöritlerin uzaması, artan NGF konsantrasyonu ile artmıştır. PC12 hücrelerinin 100 ng/mL NGF ile muamele edilmesi en büyük nörit uzunluğuna neden olmuştur (Şekil 4.16).

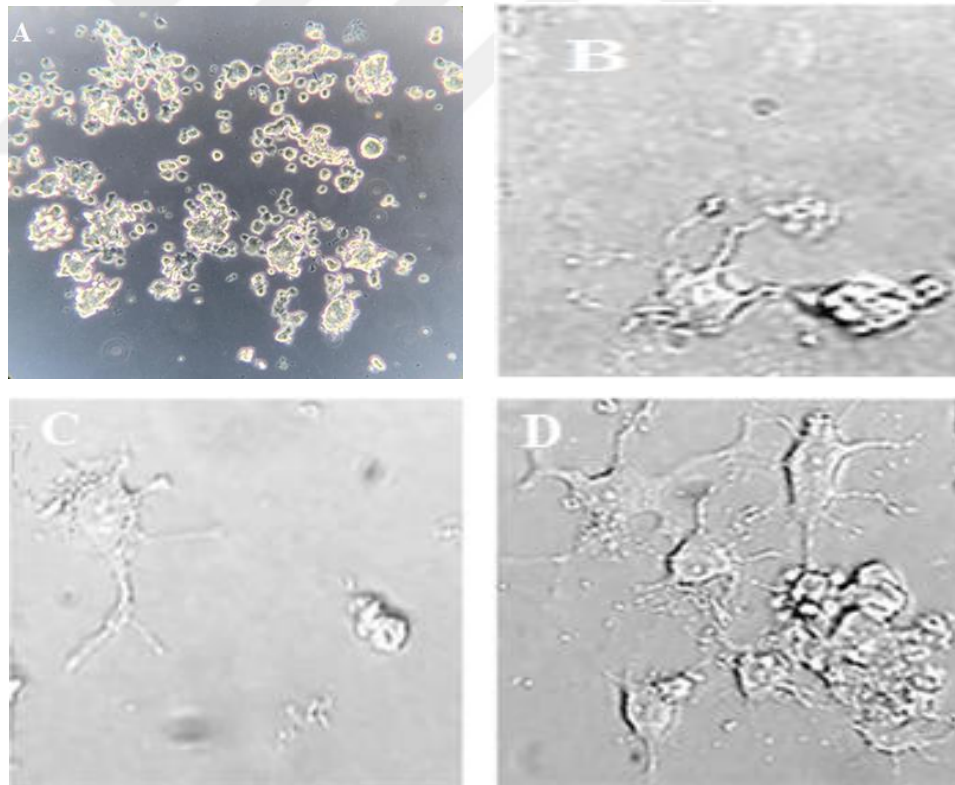


**Şekil 4.15.** Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ng/mL) NGF, 5 gün ilave edildikten sonra PC12 hücrelerinin morfolojisinin etkisi. (A) kontrol grubu ; (B) 25 ng/mL NGF; (C) 50 ng/mL NGF (D) 100 ng/mL NGF ile muamele edilmiş hücreler.

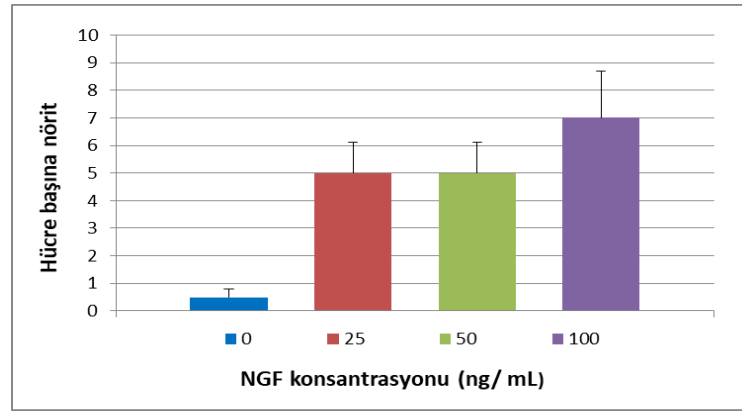


**Şekil 4.16.** Hücreler tarafından geliştirilen nöritlerin uzunluğunu gösteren diyagram

Ayrıca hücre kültüründeki NGF konsantrasyonu artışıyla hücre başına nörit sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 4.17). Böylece 100 ng/mL NGF'de hücre başına yüksek sayıda nörit elde edildiği bulundu (Şekil 4.18).



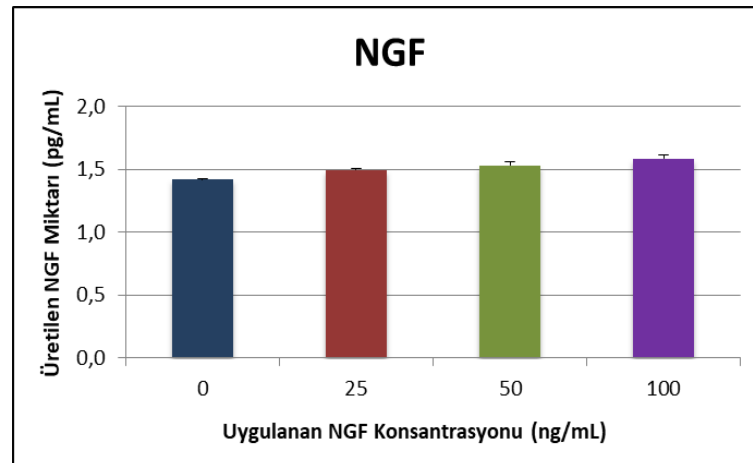
**Şekil 4.17.** PC12 hücrelerinin, hücre başına nörit sayısını gösteren nöral hücrelere farklılaşması. Kontrol, (B) 25 ng/mL NGF: hücre başına 5 nörit gözlemlendi, (C) 50 ng/mL NGF: hücre başına 5 nörit gözlemlendi ve (D) 100 ng/mL NGF: hücre başına 7 nörit gözlemlendi.



Şekil 4.18. Hücre başına geliştirilen nörit sayısını gösteren diyagram.

#### 4.7. PC12 hücrelerinin NGF üretim seviyeleri

Farklılaşma sürecindeki PC12 hücrelerinin ürettiği NGF düzeyi ELISA testi ile saptandı. NGF çözeltisi konsantrasyonunun artırılmasının, numunelerde salınan toplam NGF hacminde bir artışa yol açtığı bulunmuştur. Bu, nörit sayısı ve uzunluğu NGF konsantrasyonu ile artan hücrelerin morfolojisinde bulduğumuz sonuçlarımızı doğrulamaktadır (şekil4.19). NGF'nin kontrol grubu, hücre yapışması için kullanılan matrijelin PC12 hücrelerinin farklılaşmasına destek verdiğini gösterir.

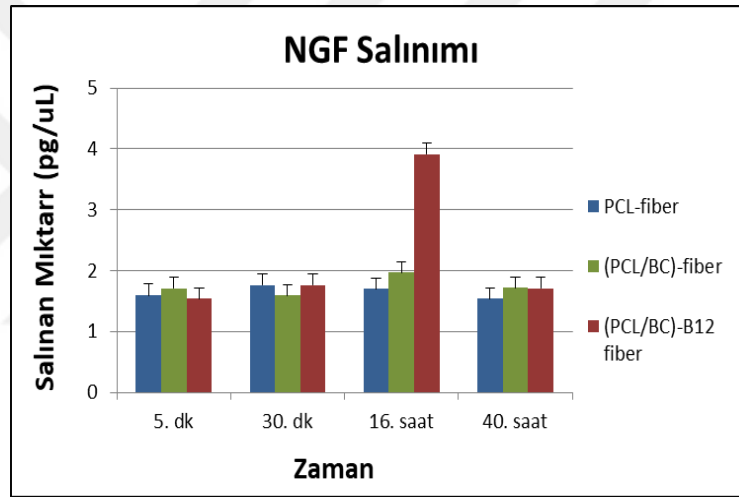


Şekil 4.19. NGF'nin ELISA testi ile teyit edilen PC12 hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkisi

Böylece, yüksek bir nöral büyüme faktörü konsantrasyonu PC12 hücrelerinin aksonal büyümesini destekler. Sonuçlarımız, nöritlerin sayısının ve uzunluğunun, NGF konsantrasyonu ile arttığını gösteren Coleman ve Wooten'ın (1994) çalışmalarına benzerdir.

#### 4.8. Elektroğirilmiş fiberlerde NGF salınımı.

NGF emdirilmiş (100 ng) fiberlerden salınan NGF konsantrasyonu ELISA testi ile değerlendirildi. Şekil 4.20'da gösterildiği gibi; 5 dakika, 30 dakika, 16 saat ve 40 saat inkübasyonundan sonra NGF ilave edildiği nanofiberleri (PCL ve PCL/BC) neredeyse eşit NGF seviyelerinde ortaya çıktı (1,5 ila 1,9 pg/mL arasında). Ancak, 16 saat sonra (PCL/BC)-B12 nanofiberler için (3,9 pg/mL) NGF salınımı gözlemlendi ve 40 saat sonra azaldı (Şekil 4.20). Bu, sentezlenen üç fiber tipinin, sinir büyüme faktörü salınımına sahip olduğunu ve 16 saat inkübasyondan sonra sinir büyüme faktörü için en iyi NGF salınım aracı olarak (PCL/BC)-B12 nanofiberler olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.20. NGF'nin üretilen üç nanofiberden (PCL nanofiber; (PCL/BC) nanofiber ve (PCL/BC) -B12 nanofiber) salınımı.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, periferik sinir rejenerasyonu için nanofiber iskeleler geliştirerek, doku rejenerasyonuna uygun olup olmadığını araştırdık. Elektroëgirilmiş nanofiber iskeleler, nöral hücre bağlanma, yayılma ve proliferasyonunu destekleme özellikleri yüzünden nöral doku rejenerasyonunda gelecek vadeden malzemelerdir. Bu iskeleler, hücre dışı matrikse benzer matriksler oluşturabilirler. Sentetik polimerlerden olan PCL, fizikokimyasal ve mekanik özellikleri, biyouyumluluğu ve toksik olmayışı nedeniyle biyomedikal uygulamalar için cazip bir polimerdir. Yaptığımız ön araştırmadan sonra, periferik sinir hasarı rejenerasyonu için geliştireceğimiz nanofiber iskele malzemesi olarak PCL yi seçtik. Ayrıca yaptığımız araştırmalarda, sinir rejenerasyonu için Mg ve B12 vitamininin de etkili olduğunu fark edince, PCL nanofiber iskeleye Mg içeren biyoaktif cam ve B12 vitamini de katarak üç farklı nanofiber sentezledik. İlk nanofiberimiz sadece PCL içeriyordu. Bu nanofiberler için optimum elektroëgirme parametrelerini belirledik: çözücüye göre kütlece % 10 konsantrasyon, 15 kV voltaj, 20 cm plaka mesafesi ve 2 mL/saat lik çözelti akış hızı. İkinci nanofiber türümüz, PCL/BC olarak kısalttığımız, % 70 PCL ve % 30 biyoaktif camdan ( TEOS, TEP ve MgCl<sub>2</sub> içeren) sol-jel yöntemiyle elde ettiğimiz hidrit nanofiberlerdir. Son olarak da, ikinci hibrit nanofibere, B12 vitamini ekleyerek aynı yöntemle üçüncü fiber türümüz olan (PCL/BC)-B12'yi elde ettik. Her üç fiber türünde de, elektroëgirme için optimum parametreler, PCL için bulduğumuz parametrelerle örtüştüğünden aynen kullanılmıştır. Ayrıca, bu parametrelerle üç farklı nanofiberin de yaklaşık aynı çapta elde edilmesi mümkün olmuştur.

Elde edilen nanofiberlerin karakterizasyonu SEM, EDX ve FTIR analizleri ile yapılmıştır. SEM görüntüleri, en iyi fiberlerin seçilmesini ve nanofiber çaplarının belirlenmesini sağlamıştır. PCL nanofiberler için ortalama fiber çapı  $0,73 \pm 0,32 \mu\text{m}$ , hibrit PCL/BC nanofiberler için  $0,76 \pm 0,52 \mu\text{m}$  ve B12 vitamini içeren hibrit (PCL/BC)-B12 nanofiberler için ortalama fiber çapı  $0,61 \pm 0,51 \mu\text{m}$ ' dir. EDX elementel analizleriyle, hibrit fiberlerin tüm elementlerinin homojen olarak yapıya dağıldığı, PCL/BC nanofiberler için C, O, P, Si, Mg, Cl elementlerinin varlığı ve (PCL/BC)-B12 nanofiberler için, bu elementlere ilaveten B12 vitamininden kaynaklanan Co ve N elementlerinin

varlığı doğrulanmıştır. FTIR analizi sonuçlarından fonksiyonel gruplar tanımlanmıştır. PCL ile biyoaktif camın silanol gruplarıyla oluşan hidrojen bağlarıyla bağlandığı ispatlanmıştır.

Sentezler tamamlandıktan sonra, hücre çalışmalarına başlandı. PC12 hücreler ve L929 fibroblastik hücreler üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılık testleri, bu fiberlerin toksik olmadığını ve hücre proliferasyonunu sağladığını göstermiştir. MTT testinde, L929 hücreleri için, 72 saat sonunda en yüksek hücre canlılığı (PCL/BC)-B12 nanofiberlerde gözlemlendi. PC-12 hücreleriyle yapılan MTT testlerinin sonucunda ise en yüksek proliferasyon, PCL/BC nanofiberlerde gözlemlenmiştir. Daha sonra, sinir büyüme faktörü (NGF) tarafından indüklenen PC12 hücrelerinin hücreSEL farklılaşması, bu hücrelerin morfolojik modifikasyonu ile belirlendi. Nanofiberlerde kültüre edilen PC12 hücrelerinin kristal viyole ile boyandıktan sonra inverted mikroskoptaki görüntüleri analiz edildi ve nöritlerin uzunluğu imageJ yazılımı ile ölçüldü. Nöritlerin uzaması, artan NGF konsantrasyonu ile artmıştır. PC12 hücrelerinin 100 ng/mL NGF ile muamele edilmesi en büyük nörit uzunluğuna neden olmuştur. PC12 hücreleri üzerindeki NGF'nin biyoaktivitesi, ELISA testi ile de doğrulandı.

Üretilen her üç fiber de, NGF'nin fiberlere enjeksiyonundan sonraki ilk beş dakika içinde sinir büyüme faktörü salınımı kapasitesine sahiptir. 16 saat sonra en yüksek hücre salınımı (PCL/BC)-B12 nanofiberlerde görülmüştür. Üretilen nanofiberlerin toksik olmaması, hücre proliferasyonuna destekleri ve sinir büyüme faktörü salınımı yetenekleri, bu nanofiberlerin periferik sinir lezyonlarının rejenerasyonunda doku iskelesi olarak önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

## 5.2. Öneriler

PC12 hücreleri nöronal özellikleri ifade eder ve bu nedenle sinir sistemini incelemek için faydalı model sistemleridir. PCL nanofiberleri 1970'lerden beri sıklıkla kemik rejenerasyonu için kullanıldı. Son yıllarda nöral hücrelerin yenilenmesi konusundaki PCL fiber uygulamaları gittikçe önem kazanmaktadır. PCL nanofiberler yanında PCL'ye ilave ettiğimiz B12 vitamini içeren ve içermeyen hibrit biyoaktif cam nanofiberlerle ilgili sonuçlarımız, bu kompozitlerin de hasarlı sinirin rejenere edilmesine yardımcı olan yeni bir klinik araç olabileceğini göstermektedir.

İn vitro çalışmamızda, hücre yapışması için kullandığımız matrijel, ayrıca PC12 hücrelerinin farklılaşmasına katkıda bulundu. Bu nedenle farklılaşmayı indüklemek için kolajen yerine kullanılabilir.

Bu çalışmada, sadece farklı kompozisyonlardaki nanofiberlerin, uygun nöral doku iskelesi gelişimine etkisini araştırdık. Kullanılan kompozisyon miktarının etkilerini çalışmadık. İleri araştırmalarda çalışılabilir. Ayrıca, çalışmalarımızı in vitro olarak gerçekleştirdik. İn vivo çalışmalar da gerçekleştirilebilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Aggarwal, S., Kumar, V., 2016, Neural Tissue Engineering , Materials for scaffold fabrication, 4(12), 188–192.
- Allen, N. J and Barres, B. A., 2009, *Neuroscience: Glia — more than just brain glue*, *Nature*, 457(7230), 675–677.
- Aloe, L., Rocco, M. L. Balzamino.B.O., and Micera.A.,2015, Nerve Growth Factor: A Focus on Neuroscience and Therapy, *Current Neuropharmacology*, 13, 294-303.
- Alvites, R., Rita Caseiro, A., Santos Pedrosa, S., Vieira Branquinho, M., Ronchi, G., Geuna, S., and Colette Maurício, A., 2018, *Peripheral nerve injury and axonotmesis: State of the art and recent advances*, *Cogent Medicine*, 5(1),1-45.
- Antoine, J C., 1999, Anatomie et Physiologie du Nerf Périphérique, *Encyclopédie Médico- Chirurgicale*, 14(005) , 10.
- Ayala-Caminero, R., Pinzón-Herrera, L., Rivera Martinez, C. A., and Almodovar, J., 2017, *Polymeric scaffolds for three-dimensional culture of nerve cells: a model of peripheral nerve regeneration*, *MRS Communications*, 7(03), 391–415.
- Bachar, A., 2012, Élaboration et Caractérisations de bioverres Si-Ca-Na- O et Si-Ca-Na-O-F dopés à l'Azote, Matériaux,Thèse de Doctorat,L'université De Valenciennes Et Du Hainaut-Cambresis, Université Mohammed V-Agdal ,Sciences Pour l'Ingénieur,Rabat 1-218.
- Badylak, S. F., Taylor, D. and Uygun, K., 2011,Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Matrix Scaffolds,(13),27-53.
- Baino, F., Novajra, G., Miguez-Pacheco, V., Boccaccini, A. R., and Vitale-Brovarone, C., 2016, *Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system*, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 432, 1530.
- Bazin, A., Influence de la Technique des Chambres Veineuses sur la Recuperation Sensitive lors des Sutures Nerveuses,2013.
- Beachley,V., Wen, X., 2009, Effect of electrospinning parameters on the nano fiber diameter and length , *Materials Science and Engineering C*, 29(3), 663–668.
- Berry, A., Bindocci, E and Alleva, E., 2012, *NGF, Brain and Behavioral Plasticity*, *Neural Plasticity*, 1–9.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., and Yarmush, M. L.,2011, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1), 403–430.
- Bhattacharai, D., Aguilar, L., Park, C., and Kim, C., 2018, *A Review on Properties of Natural and Synthetic Based Electrospun Fibrous Materials for Bone Tissue Engineering*, *Membranes*, 8(3), 62.

- Bini, T. B., Gao, S., Tan, T. C., Wang, S., Lim, A., Hai, L. B., and Ramakrishna, S., 2004, *Electrospun poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer nanofibre tubes for peripheral nerve regeneration. Nanotechnology, 15(11), 1459–1464.*
- Blaise-Harrissart, A., 2008, Evaluation de la reconstruction osseuse après implantation de blocs poreux en bioverre dans les condyles fémoraux de lapin.
- Boccaccini, A. R., 2016, Bioactive Glasses in Soft Tissue Repair: Advances and Challenges, 13 (2015): 2016.
- Bonini, S., Rasi, G., Bracci-Laudiero, M. L., Procoli, A., and Aloe, L., 2003, Nerve Growth Factor: Neurotrophin or Cytokine, *International Archives of Allergy and Immunology*, 131(2), 80–84.
- Boni, R., Ali, A., Shavandi, A., and Clarkson Andrew, N., 2018, Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering, *Journal of Biomedical Science*, 8, 1–21.
- Bonnard, C., 1989, Biologie et régénération nerveuse, *Annales de Chirurgie de La Main*, 8(4), 285–288.
- Bugnicourt, G., 2011, Adhésion, Croissance et Polarisation de Neurones Sur Substrats Micro-et Nano-Structurés, Thèse de Doctorat, Université Grenoble Alpes, Physique, Grenoble, 1-213.
- Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., and Cao, Y., 2008, *Collagen Tissue Engineering: Development of Novel Biomaterials and Applications. Pediatric Research, 63(5), 492–496.*
- Chan, B. P., and Leong, K. W., 2008, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. European Spine Journal, 17(S4), 467–479.*
- Chen, S. L., 2015, Repair, protection and regeneration of peripheral nerve injury, *Neural Regeneration Research*, 10(11), 1777–1798.
- Chimutengwende-Gordon, M., and Khan, W., 2012, Recent Advances and Developments in Neural Repair and Regeneration for Hand Surgery, *The Open Orthopaedics Journal*, 6(13), 103–107.
- Chircov, C., Grumezescu, A. M., Bejenaru, L. E., 2018, *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 59, 1-6.
- Choi, E. J., Choi, Y. M., Jang, E. J., Kim, J. Y., Kim, T. K., and Kim, K. H., 2016, Neural Ablation and Regeneration in Pain Practice, *The Korean Journal of Pain*, 29(1), 3.
- Cohen, S., 1960, Purification Of a Nerve-Growth Promoting Protein From The Mouse Salivary Gland And Its Neuro-Cytotoxic Antiserum, *Biochemistry*. 46, 302-311.

- Cowan, W. M., Hamburger, V. and Levi-Montalcini, R., 2001, The path to the discovery of nerve growth factor, *Annual Review of Neuroscience*, 24, 551–600.
- Dahlin, R. L., Kasper, F. K., and Mikos, A. G., 2011, *Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering, Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), 349–364.
- Danie Kingsley, J., Ranjan, S., Dasgupta, N., and Saha, P., 2013, *Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. Journal of Pharmacy Research*, 7(2), 200–204.
- Deckwerth, T. L., 1993, *Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor, The Journal of Cell Biology*, 123(5), 1207–1222.
- Deitzel, J., Kleinmeyer, J., Harris, D., and Beck Tan, N., 2001, *The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, Polymer*, 42(1), 261–272.
- Deneufchâtel, M., 2016, *Biomatériaux auto-supportés et dégradables pour l'ingénierie tissulaire: association d'un gel de fibrine et d'un réseau de polymère synthétique, Thèse de Doctorat, Université de Cergy Pontoise, Paris-Seine*, 1-265.
- De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P., and De Clerck, K., 2008, *The effect of temperature and humidity on electrospinning, Journal of Materials Science*, 44(5), 1357–1362.
- Dinis, T. M., Elia, R., Vidal, G., Auffret, A., Kaplan, D. L., and Egles, C., 2014, *Method to Form a Fiber/Growth Factor Dual-Gradient along Electrospun Silk for Nerve Regeneration. ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(19), 16817–16826.
- Dinis, T. M., 2014, *Prothèse nerveuse artificielle à partir de fibroïne de soie pour la réparation et la régénération de nerfs périphériques, Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Biomécanique, Compiègne*, 1-258.
- Dworkin, R. H., Backonja, M., Rowbotham, M. C., Allen, R. R., Argoff, C. R., Bennett, G. J., ... Weinstein, S. M., 2003, *Advances in Neuropathic Pain, Archives of Neurology*, 60(11), 1524.
- Eap, S., 2014, *Développement d'implants nanofibreux actifs pour la régénération osseuse, Thèse de Doctorat, Université de Strasbourg, Biomatériaux, Strasbourg*, 1-258.
- Li, Z., and Wang, C., 2013, *One-Dimensional nanostructures, SpringerBriefs in Materials*, springerbriefsin materials, 1-141.
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M., and Elgindy, N. A., 2012, Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 161(1), 38–49.

- Evans, G. R. D., 2001, *Peripheral nerve injury: A review and approach to tissue engineered constructs*, *The Anatomical Record*, 263(4), 396–404
- Feltz, K. P., Kalaf, E. A. G., Chen, C., Martin, R. S., and Sell, S. A., 2017, *A review of electrospinning manipulation techniques to direct fiber deposition and maximize pore size*, *Electrospinning*, 1(1).
- Fiume, E., Barberi, J., Verné, E., and Baino, F., 2018, *Bioactive Glasses : From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies*, *Journal of Functional Biomaterials*, (9),24.
- Formhals, A. US Patent 1975504, 1934.
- Gabay, O., Sanchez, C., and Taboas, J. M., 2010, *Bio-ingénierie du cartilage*, *Revue Du Rhumatisme*, 77(4), 319–322.
- Gao, X., Wang, Y., Chen, J., and Peng, J., 2013, *The role of peripheral nerve ECM components in the tissue engineering nerve construction*, *Reviews in the Neurosciences*, 24(4).
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.-H., and Ramakrishna, S., 2008, *Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. *Biomaterials*, 29(34), 4532–4539.
- Golin. A. P., 2014, *Humidity Effect on the Structure of Electrospun Core-Shell PCL-PEG Fibers for Tissue Regeneration Applications*, Masterthesis, The University of Western Ontario, Department of Chemical and Biochemical Engineering, London, 1-118.
- Graham, T., 1864, *On the Properties of Silicic Acid and other Analogous Colloidal Substances*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 13(0), 335–341.
- Gröber, U., Kisters, K., and Schmidt, J., 2013, *Neuroenhancement with Vitamin B12 Underestimated Neurological Significance*. *Nutrients*, 5(12), 5031–5045.
- Gu, X., Ding, F., and Williams, D. F., 2014, *Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration*, *Biomaterials*, 35(24), 6143–6156.
- Haider, A., Haider, S., and Kang, I. K., 2015, *A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology*, *Arabian Journal of Chemistry*, 1-24.
- Hench, L. L., 2006, *The story of Bioglass®*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967–978.
- Hench, L. L., 2001, *Bioglass and Similar Materials*. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 563–568.
- Hu, R., Cao, Q., Sun, Z., Chen, J., Zheng, Q., and Xiao, F., 2017, *A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction*

- medium International Journal of Molecular Medicine*, 41, 195-201
- Jones, A. R., Russell, H. J., Greetham, G. M., Towrie, M., Hay, S., and Scrutton, N. S., 2012, *Ultrafast Infrared Spectral Fingerprints of Vitamin B12 and Related Cobalamins*, *The Journal of Physical Chemistry A*, 116(23), 5586–5594.
- Jones, J. R., 2013, *Review of bioactive glass: From Hench to hybrids*, *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4457–4486.
- Karasu, B., Yanar, A.O., Koçak, A., Kısacık, Ö., 2017, *Bioactive Glasses*, *El-Cezerî Journal of Science and Engineering*, 4(3), 436-471.
- Koike, T., 1992, *Molecular and Cellular Mechanism of Neuronal Degeneration Caused by Nerve Growth Factor Deprivation Approached through PC12 Cell Culture*, *Prog. NeuroPsychopharmacol and Biol. Psychiat*, 16, 95-106.
- Koudehi, M. F., Fooladi, A. A. I., Mansoori, K., Jamalpoor, Z., Amiri, A., and Nourani, M. R., 2013, *Preparation and evaluation of novel nano-bioglass/gelatin conduit for peripheral nerve regeneration*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(2), 363–373.
- Kumbar, S. G., Nair, L. S., Bhattacharyya, S., and Laurencin, C. T., 2006, *Polymeric Nanofibers as Novel Carriers for the Delivery of Therapeutic Molecules*, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(9), 2591–2607.
- Laming, P. R., Kimelberg, H., Robinson, S., Salm, A., Hawrylak, N., Müller, C., Ng, K., 2000, *Neuronal–glial interactions and behavior*, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(3), 295–340.
- Langer, R. and Vacanti, J.P., 1993, *Tissue engineering*. *Science*, 260(5110), 920- 926.
- Lee, E. J., Kasper, F. K., and Mikos, A. G., 2013, *Biomaterials for Tissue Engineering*, *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), 323–337.
- Lee, S. K., and Wolfe, S. W., 2000, *Peripheral Nerve Injury and Repair*, 8(4), 243–252.
- Luc, G., Durand, M., Collet, D., Guillemot, F., and Bordenave, L., 2014, *Esophageal tissue engineering*, *Expert Review of Medical Devices*, 11(2), 225–241.
- Lu, T., Li, Y., and Chen, T., 2013, *Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*. *International Journal of Nanomedicine*, 20, 3-8.
- Madigan, N. N., McMahon, S., O'Brien, T., Yaszemski, M. J., and Windebank, A. J., 2009, *Current tissue engineering and novel therapeutic approaches to axonal regeneration following spinal cord injury using polymer scaffolds*. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 169(2), 183–199.
- Magnifico, S., 2012, *Les mécanismes moléculaires de la dégénérescence axonale dans un contexte de type Dying back pattern*, Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Neurosciences, Paris VI, 1-268.

- Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S., ... Reis, R. L., 2007, *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends*. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(17), 999–1030.
- Ma, P. X., 2004, *Scaffolds for tissue fabrication*. *Materials Today*, 7(5), 30–40.
- Maquet, V., and Jerome, R., 1997, *Design of Macroporous Biodegradable Polymer Scaffolds for Cell Transplantation*, *Materials Science Forum*, 250, 15–42.
- Marieb, E.N., 2006, *Human Anatomy and Physiology*, Ninth Edition, 1-60.
- Marquardt, L. M., Day, D., Sakiyama-Elbert, S. E., and Harkins, A. B., 2013, *Effects of borate-based bioactive glass on neuron viability and neurite extension*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(8), 2767–2775.
- McKee, M. G., Wilkes, G. L., Colby, R. H., and Long, T. E., 2004, *Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters*, *Macromolecules*, 37(5), 1760–1767.
- Mele, E., 2016, *Electrospinning of natural polymers for advanced wound care: towards responsive and adaptive dressings*, *Journal of Materials Chemistry B*, 4(28), 4801–4812.
- Megelski, S., Stephens, J. S., Chase, D. B., and Rabolt, J. F., 2002, *Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers*, *Macromolecules*, 35(22), 8456–8466.
- Michelina, C., Flavi, B., 2012, *Synthesis and Characterization of Amorphous and Hybrid Materials Obtained by Sol-Gel Processing for Biomedical Applications*. *Biomedical Science, Engineering and Technology* (16), 390-416.
- Miguez-Pacheco, V., Greenspan, D., Hench, L. L., and Boccaccini, A. R., 2015, *Bioactive glasses in soft tissue repair*, *American Ceramic Society Bulletin*, 94 (6).
- Mohammadkhah, A., Marquardt, L. M., Sakiyama-Elbert, S. E., Day, D. E., and Harkins, A. B., 2015, *Fabrication and characterization of poly-( $\epsilon$ )-caprolactone and bioactive glass composites for tissue engineering applications*, *Materials Science and Engineering: C*, 49, 632–639.
- Nezarati, R. M., 2014, *Development of Electrospun Tissue Engineering Scaffolds with Tunable Properties*, Doctoral Thesis, Texas A&M University, Biomedical Engineering, Texas, 1-130.
- Nezarati, R. M., Eifert, M. B., and Cosgriff-Hernandez, E., 2013, *Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology*. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(10), 810–819.

- Oliveira, S. M., Ringshia, R. A., Legeros, R. Z., Clark, E., Yost, M. J., Terracio, L., and Teixeira, C. C., 2010, *An improved collagen scaffold for skeletal regeneration, Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 371-379.
- United States Organ Transplantation, Annual Data Report, , 2011, Health Resource and Service Administration, 5-227.
- Owens, G. J., Singh, R. K., Foroutan, F., Mustafa Alqaysi, M., Han, C-M., Mahapatra, C., Hae-Won Kim, H-W., Knowles, J.C., 2016, Sol-gel based materials for biomedical applications, *Progress in Materials Science*, 77, 1-79.
- Özsağiroğlu, E., 2011, Enzimatik Polimerizasyon İle Sentezlenen Polikaprolaktona Reaksiyon Koşullarının Etkisinin Ve Polikaprolaktonun Biyobozunurluğunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1-89.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., and Berthod, F., 2010, *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. Materials*, 3(3), 1863-1887.
- Pham, Q. P., Sharma, U., and Mikos, A. G., 2006, *Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review, Tissue Engineering*, 12(5), 1197-1211.
- Raff, M. C., 2002, *Axonal Self-Destruction and Neurodegeneration, Science*, 296(5569), 868-871.
- Rajput, M., 2012, Optimization of Electrospinning Parameters to Fabricate Aligned Nanofibers for Neural Tissue Engineering, Master Thesis, National Institute of Technology, Technology & Medical Engineering, Rourkela, Orissa, 1-74.
- Sajjadi., Pooyan, S., 2005, Sol-Gel Process and Its Application in Nanotechnology, *Journal of Polymer Engineering and Technology*, (13), 38-41.
- Schmidt, C. E., and Leach, J. B., 2003, Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5(1), 293-347.
- Seddon, H. J., 1943, Three Types of Nerve Injury, *Brain*, 66(4), 237-288.
- Sensharma, P., Madhumathi, G., Jayant, R. D., and Jaiswal, A. K., 2017, *Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices, Materials Science and Engineering: C*, 77, 1302-1315.
- Seigneurin, D., Boutonnat, J., *Tissu Nerveux*, 2012. chapter 6, 1-55.
- Sherman, V. R., Yang, W., and Meyers, M. A., 2015, *The materials science of collagen, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 52, 22-50.
- Shin, H., Jo, S., and Mikos, A. G., 2003, *Biomimetic materials for tissue engineering, Biomaterials*, 24(24), 4353-4364.
- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., and Trehan, A., 2004, *Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. International Journal of*

*Pharmaceutics*, 278(1), 1–23.

- Sivolella, S., Brunello, G., Ferrarese, N., Della Puppa, A., D'Avella, D., Bressan, E., and Zavan, B., 2014, *Nanostructured Guidance for Peripheral Nerve Injuries: A Review with a Perspective in the Oral and Maxillofacial Area*, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 3088–3117.
- Snigdha. S, Sabu, T., Radhakrishnan, E. K. R, 2017, Polymer Based Tissue Engineering Strategies for Neural Regeneration, *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(1), 1–6.
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., and Zheng, Z., 2018, *Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications*, *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3117–3145.
- Stabenfeldt, S. E., García, A. J., and LaPlaca, M. C., 2006, *Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 77A(4), 718–725.
- Stratton, S., Shelke, N., Hoshino, K., Rudraiah, S., and Kumbar, S. G., 2016, *Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering*, *Bioactive Materials*, 1(2), 93–108.
- Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock R. W., Parameswaran, S., and Ramkumar, S. S., 2005, *Electrospinning of nanofibers*, *Journal of Applied Polymer Science*, 96(2), 557–569.
- Su, K., and Wang, C., 2015, *Recent advances in the use of gelatin in biomedical research*, *Biotechnology Letters*, 37(11), 2139–2145.
- Sukigara, S., Gandhi, M., Ayutsede, J., Micklus, M., and Ko, F., 2003, *Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties*, *Polymer*, 44(19), 5721–5727.
- Sulaiman, W.A.R., Kline, D.G., 2006, Nerve surgery: a review and insights about its future, *Clin Neurosurg*, (53), 38–47.
- Sunderland, S., 1951, *A Classification Of Peripheral Nerve Injuries Producing Loss Of Function*, *Brain*, 74(4), 491–516.
- Swindle-Reilly. K. E, Paranjape. C. S. and Miller. C. A, 2014, Electrospun poly(caprolactone)-elastin scaffolds for peripheral nerve regeneration. *Progress in Biomaterials*, 3(1).
- Tateishi, T., and Chen, G. P., 2005, *Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering*, *Key Engineering Materials*, 288-289, 59–62.
- Toygun.Ş, Köneçoğlu. G, Kalpaklı. Y, 2013, General Principles of Sol-Gel, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31, 456–476.

- Tu, S., and Tu, J., 2017, *Stem Cell Therapy in Traumatic Brain Injury, Neurological Regeneration*, 13–48.
- Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., Merkle, H.P., Gander, B., Meinel, L., 2007, Silkfibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF), *Biomaterials*, 28(30), 4449–4460.
- Vacanti, J. P., and Langer, R., 1999, *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation, The Lancet*, 354, S32–S34.
- Vallet-Regí, M., Ragel, C. V., and Salinas, A. J., 2003, *Glasses with Medical Applications, European Journal of Inorganic Chemistry*, 2003(6), 1029–1042.
- Vasita. R and Katti. D. S, 2006, Nanofibers and their applications in tissue engineering, *International Journal of Nanomedicine* ,1(1), 15–30.
- Verdonck, M., 2018, Interaction Of Neural Cell Types With Plasma-Activated Nanofibers For Peripheral Nerve Regeneration, Master Thesis, Ghent University, Faculty Of Medecine And Health Sciences, 1-51.
- Wang, H., Wang, R., Thrimawithana, T., Little, P. J., Xu, J., Feng, Z.-P., and Zheng, W., 2014, *The Nerve Growth Factor Signaling and Its Potential as Therapeutic Target for Glaucoma. BioMed Research International*, 2014, 1–10.
- Wang, X., 2013, Fabrication of Electrospun Fibrous Meshes and 3D Porous Titanium Scaffolds for Tissue Engineering, Doctoral Thesis, Peking University, Georgia Institute of Technology, Pekin, 1-122.
- Wu, F., Xu, K., Liu, L., Zhang, K., Xia, L., Zhang, M., Hu, A., 2019, *Vitamin B12 Enhances Nerve Repair and Improves Functional Recovery After Traumatic Brain Injury by Inhibiting ER Stress-Induced Neuron Injury, Frontiers in Pharmacology*, 10(406), 1-12..
- Xu, J., and Xu, S., 2018, Possible Reason for the High Metabolic Rate in Neurons of a Brain, *Austin Journal of Women's Health*, 5(1), 1031.
- Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., and Chua, C-K, 2001, *The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering, Part I. Traditional Factors. Tissue Engineering*, 7(6), 679–689.
- Yi, S., Ding, F., Gong, L., and Gu, X., 2017, Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Current Stem Cell Research and Therapy*, 12(3), 233–246.
- Yu, W., Zhao, W., Zhu, C., Zhang, X., Ye, D., Zhang, W., Zhang, Z., 2011, *Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly( $\epsilon$ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate, BMC Neuroscience*, 12(1), 68.
- Zargham, S., Bazgir, S., Tavakoli, A., Rashidi, A. S., and Damerchely, R., 2012, *The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6*

*Nanofiber, Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 7(4), 1-49.

]Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y., and Sheng, J., 2005, *Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats*, *European Polymer Journal*, 41(3), 423–432.

Ziabari, M., Mottaghtalab, V., and Haghi, A., 2009, *Application of direct tracking method for measuring electrospun nanofiber diameter*, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 53–62.

Znaidi, L., 2010, *Sol–gel-deposited ZnO thin films: A review*, *Materials Science and Engineering: B*, 174(1-3), 18–30.

Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S., and Chu, B., 2002, *Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes*, *Polymer*, 43(16), 4403–4412.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Saandia BACAR  
**Uyruğu** : KOMORLAR BİRLİĞİ  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Milembeni İtsandra - 30.09.1993  
**Telefon** : 5394473213  
**Faks** :  
**e-mail** : moifaka00@gmail.com

### EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Madaris-AL-Iman ,Moroni,Komor	2013
Üniversite	: Bilim ve Teknoloji Fakültesi,Moroni,Komor	2016
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	-
Doktora	:	

### UZMANLIK ALANI

**YABANCI DİLLER** : Fransızca, İngilizce, Türkçe

### BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

### YAYINLAR

#### Poster olarak sununan ve özet yayınlanan bildirileri

Saandia Bacar, Gurbuz Comak, Modelling the growth kinetic of Pseudomonas pseudoalcaligenes in M9 medium under the different environmental factors, 7<sup>th</sup> International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25-27 April 2018, Necmettin Erbakan University, Konya, Turkey.